

# **Modulation der Immunantwort in der mikrobiellen Sepsis durch lösliche Toll-like Rezeptoren**



## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der naturwissenschaftlichen  
Fakultät IV - Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Philipp Groß  
aus Regensburg  
2009

**Promotionsgesuch eingereicht am 22.01.2009**

**Die Arbeit wurde angeleitet von:**

Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heilmann, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für  
Pharmazeutische Biologie

Prof. Dr. rer. nat. Werner Falk, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

**Prüfungsausschuss:**

|                           |                                 |
|---------------------------|---------------------------------|
| Vorsitzender:             | Prof. Dr. rer. nat. S. Elz      |
| 1. Gutachter (1. Prüfer): | Prof. Dr. rer. nat. J. Heilmann |
| 2. Gutachter (2. Prüfer): | Prof. Dr. rer. nat. W. Falk     |
| 3. Prüfer:                | Prof. Dr. med. R. Warth         |

Tag der mündlichen Prüfung: 4. März 2009

## **Dissertation**

durchgeführt von Dezember 2005 bis Oktober 2008  
an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Universität Regensburg  
unter Anleitung von

Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heilmann  
Institut für Pharmazie

und

Prof. Dr. rer. nat. Werner Falk  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I

Ich kann nicht sagen, die Existenz von Gott ist unmöglich, sie erscheint mir nur sehr unwahrscheinlich. Und das ist Naturwissenschaft. Sie stellen sich eine Frage und machen ein Experiment und schauen, was dabei herauskommt. Es macht mir keine Angst, wenn ich etwas nicht weiß.

*Richard P. Feynman (1918-1988)*



# Inhaltsverzeichnis

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Das Immunsystem zur Infektionsabwehr .....</b>                                  | <b>1</b>  |
| 1.1.1      | Das angeborene Immunsystem .....   | 1         |
| 1.1.2      | Das adaptive Immunsystem.....  | 2         |
| <b>1.2</b> | <b>Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems .....</b>                           | <b>3</b>  |
| <b>1.3</b> | <b>Toll-like Rezeptoren.....</b>   | <b>5</b>  |
| 1.3.1      | Drosophila Toll .....  | 5         |
| 1.3.2      | Toll Proteine der Wirbeltiere.....   | 6         |
| 1.3.2.1    | LPS-Erkennung über TLR4/MD-2 .....   | 8         |
| 1.3.2.2    | TLR2.....  | 10        |
| <b>1.4</b> | <b>TLR Signaltransduktion .....</b>  | <b>11</b> |
| 1.4.1      | MyD88-abhängige Signaltransduktion .....   | 11        |
| 1.4.2      | TRIF-abhängige Signaltransduktion .....  | 13        |
| 1.4.3      | Negativregulierung der TLR-Signaltransduktion .....                                | 14        |
| <b>1.5</b> | <b>Bedeutung der TLRs für den Pathomechanismus von Infektionskrankheiten .....</b> | <b>15</b> |
| <b>1.6</b> | <b>Möglichkeiten der Beeinflussung der TLR Signaltransduktion.....</b>             | <b>17</b> |
| 1.6.1      | Neutralisierung von LPS .....  | 17        |
| 1.6.2      | Modulation der Signaltransduktion auf Rezeptorebene .....                          | 18        |
| 1.6.3      | Lösliche Rezeptoren .....  | 18        |
| 1.6.3.1    | Natürlich vorkommende lösliche Rezeptoren.....                                     | 18        |
| 1.6.3.2    | Lösliche TLR-Fusionsproteine.....  | 19        |
| 1.6.3.2.1  | Die LPS-Trap .....   | 19        |
| 1.6.3.2.2  | Lösliche TLR2-Fc Fusionsproteine .....   | 20        |
| <b>1.7</b> | <b>Zielsetzung .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>2</b>   | <b>MATERIAL .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Geräte .....</b>  | <b>22</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Verbrauchsmaterial .....</b>  | <b>22</b> |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>2.3</b>  | <b>Chemikalien und Reagenzien .....</b>                                       | <b>23</b> |
| <b>2.4</b>  | <b>Enzyme und Kits .....</b>  | <b>24</b> |
| <b>2.5</b>  | <b>Bakterien und Zelllinien .....</b>   | <b>24</b> |
| 2.5.1       | E. coli Stämme .....  | 24        |
| 2.5.2       | Sonstige Bakterienstämme .....  | 25        |
| 2.5.3       | Eukaryontische Zellen.....  | 25        |
| <b>2.6</b>  | <b>Zellkulturmedien und -zusätze.....</b>                                     | <b>25</b> |
| 2.6.1       | Bakterienkultur .....   | 25        |
| 2.6.2       | Eukaryontische Zellkultur .....   | 26        |
| <b>2.7</b>  | <b>Vektoren , Plasmide und Viren .....</b>                                    | <b>26</b> |
| <b>2.8</b>  | <b>Oligonukleotidsequenzen .....</b>  | <b>26</b> |
| 2.8.1       | Kontrollprimer für cDNA .....   | 27        |
| 2.8.2       | Sequenzierprimer .....  | 27        |
| 2.8.3       | Primer .....  | 27        |
| 2.8.4       | Synthetische Oligonukleotide.....   | 28        |
| <b>2.9</b>  | <b>Größenstandards .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>2.10</b> | <b>Antikörper und Kopplungsreagenzien .....</b>                               | <b>29</b> |
| <b>2.11</b> | <b>Puffer und Lösungen.....</b>   | <b>30</b> |
| 2.11.1      | Lösungen und Zubehör für die Agarose-Gelelektrophorese .....                  | 30        |
| 2.11.2      | Lösungen und Zubehör für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ..... | 30        |
| 2.11.3      | Sonstige Puffer und Lösungen .....  | 31        |
| <b>3</b>    | <b>METHODEN .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Molekularbiologische Methoden .....</b>                                    | <b>32</b> |
| 3.1.1       | Isolierung von RNA aus Zellen.....  | 32        |
| 3.1.2       | Gewinnung von cDNA durch Reverse Transkriptase - PCR .....                    | 32        |
| 3.1.3       | Klonierung von DNA-Fragmenten .....   | 33        |
| 3.1.3.1     | Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....   | 33        |
| 3.1.3.2     | Restriktionsverdau .....  | 33        |
| 3.1.3.3     | Gelelektrophorese .....   | 34        |
| 3.1.3.4     | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....                           | 34        |
| 3.1.3.5     | Enzymatische Manipulation der DNA.....  | 34        |
| 3.1.3.5.1   | Dephosphorylierung mit SAP .....  | 34        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.1.3.5.2  | Behandlung mit Klenow-Fragment.....                             | 35        |
| 3.1.3.6    | Ligation von DNA-Fragmenten.....                                | 35        |
| 3.1.4      | Vermehrung und Gewinnung von Plasmidvektoren.....               | 36        |
| 3.1.4.1    | Transformation und Kultivierung von <i>E. coli</i> .....        | 36        |
| 3.1.4.2    | Mini-/ Maxipräparation von Plasmiden .....                      | 37        |
| 3.1.4.3    | Sequenzierung von Plasmid-DNA.....                              | 37        |
| <b>3.2</b> | <b>Zellkultur.....</b>  | <b>37</b> |
| 3.2.1      | Kulturbedingungen .....   | 37        |
| 3.2.2      | Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung .....                        | 38        |
| 3.2.3      | Transfektionen.....   | 38        |
| 3.2.4      | Transwell-Assay .....   | 39        |
| 3.2.5      | Zellkultur adenoviral infizierter QBI293A.....                  | 39        |
| 3.2.5.1    | Vermehrung von Adenoviren.....                                  | 40        |
| 3.2.5.2    | Isolierung von Adenoviren.....                                  | 40        |
| 3.2.5.3    | Bestimmung des adenoviralen Titers .....                        | 40        |
| <b>3.3</b> | <b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>                        | <b>41</b> |
| 3.3.1      | Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE .....                      | 41        |
| 3.3.2      | Western Blotting.....   | 42        |
| 3.3.3      | Nachweis von Proteinen .....                                    | 42        |
| 3.3.3.1    | Direkte Färbung von Proteinen in Gelen.....                     | 42        |
| 3.3.3.2    | Immunofärbung von Proteinblots .....                            | 43        |
| 3.3.4      | Bestimmung der Proteinkonzentration.....                        | 43        |
| 3.3.5      | Isolierung der LPS-Trap aus Zellüberständen .....               | 44        |
| 3.3.5.1    | Protein G Affinitätschromatographie .....                       | 44        |
| 3.3.5.2    | Affinitätschromatographie über Metallchelatbindende Säulen..... | 44        |
| 3.3.5.3    | Isolierung über Ionenaustauschersäule .....                     | 45        |
| 3.3.6      | Größenausschlusschromatographie .....                           | 45        |
| <b>3.4</b> | <b>Immunologische Methoden .....</b>                            | <b>45</b> |
| 3.4.1      | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....                  | 45        |
| 3.4.2      | Multi-Zytokinbestimmungen im Luminex® 100.....                  | 46        |
| 3.4.3      | LPS-Trap-Bindungsassays .....                                   | 47        |
| 3.4.3.1    | LPS Pull-down Assay .....                                       | 47        |
| 3.4.3.2    | Bindungs-Assay mit <sup>14</sup> C-Fettsäuren .....             | 48        |
| 3.4.3.3    | LPS-Bindungs-ELISA .....  | 48        |
| 3.4.3.4    | Fusionsprotein-Bindungs-ELISAs .....                            | 48        |
| 3.4.3.5    | Bakterien-Bindungs-Assays .....                                 | 49        |
| 3.4.4      | Phagozytoseassay .....  | 50        |
| 3.4.5      | Komplementaktivierungsassay .....                               | 50        |
| 3.4.6      | Durchflusszytometrie.....                                       | 50        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>3.5</b> | <b>Tierexperimente .....</b>   | <b>51</b> |
| 3.5.1      | Adenovirale Infektion.....   | 51        |
| 3.5.2      | Gewinnung von Serum aus Vollblut.....  | 51        |
| 3.5.3      | Überprüfung der LPS-Trap-Fc(Ad)-Serumspiegel .....   | 52        |
| 3.5.4      | LPS Stimulation von Mäusen .....   | 52        |
| <b>3.6</b> | <b>Statistik.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>4</b>   | <b>ERGEBNISSE .....</b>  | <b>53</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Modulation der TLR4-Signaltransduktion durch die LPS-Trap-Fc .....</b>                    | <b>53</b> |
| 4.1.1      | Produktion der LPS-Trap-Fc in verschiedenen Zellsystemen .....                               | 53        |
| 4.1.1.1    | Schneider S2-Zellen .....  | 54        |
| 4.1.1.1.1  | Klonierung der LPS-Trap-Fc in pMT/Hygro .....  | 54        |
| 4.1.1.1.2  | Expression der LPS-Trap-Fc .....   | 55        |
| 4.1.1.1.3  | Reinigung der LPS-Trap-Fc .....  | 56        |
| 4.1.1.2    | Escherichia coli.....  | 56        |
| 4.1.1.2.1  | Klonierung der LPS-Trap-Fc in pET-22b(+). .....  | 57        |
| 4.1.1.2.2  | Expression der LPS-Trap-Fc in BL21(DE3) pLysS.....   | 57        |
| 4.1.1.3    | QBI293A-Zellen .....   | 59        |
| 4.1.1.3.1  | Klonierung der LPS-Trap-Fc in pIRESneo3.....   | 59        |
| 4.1.1.3.2  | Expression der LPS-Trap-Fc in QBI293A.....   | 60        |
| 4.1.1.4    | Baculovirussystem.....   | 60        |
| 4.1.1.4.1  | Klonierung der LPS-Trap-Fc in pFastBac1 .....  | 61        |
| 4.1.1.4.2  | Expression der LPS-Trap-Fc in Sf-21 und High Five™ Zellen .....                              | 61        |
| 4.1.1.4.3  | Reinigung der LPS-Trap-Fc .....  | 63        |
| 4.1.2      | Charakterisierung der LPS-Trap-Fc.....   | 64        |
| 4.1.2.1    | Unterschiede in der Glykosylierung in Abhängigkeit vom Expressionssystem.....                | 64        |
| 4.1.2.2    | Untersuchung der LPS-Bindungsfähigkeit .....   | 65        |
| 4.1.2.3    | Inhibitorische Aktivität der LPS-Trap-Fc <i>in vitro</i> .....                               | 66        |
| 4.1.2.4    | Untersuchung alternativer Reinigungsmethoden für die LPS-Trap-Fc .....                       | 67        |
| 4.1.2.4.1  | Oligomerisierung der LPS-Trap-Fc während der Reinigung.....                                  | 68        |
| 4.1.2.4.2  | Konstruktion und Expression der His-LPS-Trap-Fc.....   | 69        |
| 4.1.2.4.3  | Einfluss unterschiedlicher Reinigungsmethoden auf die LPS-Bindungsfähigkeit .                | 70        |
| <b>4.2</b> | <b>Untersuchung weiterer Liganden für die LPS-Trap .....</b>                                 | <b>71</b> |
| 4.2.1      | Bindung und Hemmung von Paclitaxel durch die LPS-Trap-Fc .....                               | 72        |
| 4.2.2      | Untersuchung zur Bindung der LPS-Trap an Adenoviren .....                                    | 73        |
| 4.2.3      | Interaktion der LPS-Trap mit High-mobility group box 1 protein.....                          | 74        |
| 4.2.4      | Untersuchungen über Bindung von Fettsäuren an TLR4/MD-2 .....                                | 75        |
| 4.2.4.1    | Keine direkte Assoziation von <sup>14</sup> C-Öl- und Stearinsäure an der LPS-Trap-His ..... | 75        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.2.4.2    | Untersuchungen mit weiteren Fettsäuren .....  | 76         |
| <b>4.3</b> | <b>LPS-Trap-Fc als Opsonin .....</b>  | <b>78</b>  |
| 4.3.1      | Klonierung der LPS-Trap-IgG-Varianten.....  | 79         |
| 4.3.1.1    | LPS-Trap-Fc1 .....  | 79         |
| 4.3.1.2    | LPS-Trap-Fc2 .....  | 79         |
| 4.3.1.3    | LPS-Trap-Fc3 und -Fc4.....  | 80         |
| 4.3.2      | Expression der LPS-Traps-Fc1-4.....   | 80         |
| 4.3.3      | Nachweis der LPS-Bindung an den LPS-Traps-Fc1-4 .....   | 81         |
| 4.3.4      | Überprüfung der biologischen Aktivität der LPS-Traps-Fc1-4 .....                                      | 82         |
| 4.3.5      | Bindung der LPS-Trap an Bakterien .....   | 83         |
| 4.3.5.1    | Assoziation der LPS-Trap-His an <i>E. coli</i> .....  | 83         |
| 4.3.5.2    | Spezifische Bindung der LPS-Trap-Fc an Gram-negative Bakterien.....                                   | 84         |
| 4.3.5.3    | Die LPS-Trap-Fc besitzt keinen bakteriziden Effekt auf Gram-negative Bakterien ....                   | 87         |
| 4.3.6      | Modulierung der Phagozytoseaktivität .....  | 88         |
| 4.3.6.1    | Einfluss der LPS-Trap-Fc1 auf die Phagozytoseaktivität .....  | 88         |
| 4.3.6.2    | Unterschiedliche Beeinflussung der Phagozytoseaktivität durch den IgG-Isotyp der LPS-Trap-Fc .....    | 89         |
| 4.3.7      | Einfluss auf die Komplementaktivierung .....  | 91         |
| <b>4.4</b> | <b>Modifizierung der LPS-Trap-Fc.....</b>   | <b>92</b>  |
| 4.4.1      | Modifikation an der extrazellulären Domäne von TLR4 .....   | 93         |
| 4.4.1.1    | Klonierung und Expression der LPS-Trap-FcM und LPS-Trap-FcS .....                                     | 93         |
| 4.4.1.2    | Charakterisierung der verkürzten Fusionsproteine LPS-Trap-FcM und -FcS .....                          | 94         |
| 4.4.1.2.1  | LPS-Bindung durch LPS-Trap-FcM und -FcS.....  | 95         |
| 4.4.1.2.2  | Fehlende hemmende Wirkung der verkürzten Fusionsproteine <i>in vitro</i> .....                        | 95         |
| 4.4.1.2.3  | Verminderte LPS-Bindungsstärke im Vergleich zur LPS-Trap-Fc.....                                      | 96         |
| 4.4.2      | Variationen am flexiblen Linker .....   | 97         |
| 4.4.2.1    | Klonierung der Linkermutanten LPS-Trap-L-Fc, LPS-Trap-Fc(30AS) und LPS-Trap-L-Fc(30AS) .....          | 98         |
| 4.4.2.2    | Expression und LPS-Bindungsfähigkeit der Linkermutanten .....   | 99         |
| 4.4.2.3    | Schwache Erhöhung der LPS-Affinität zu den 30AS-Linkermutanten .....                                  | 99         |
| <b>4.5</b> | <b>Untersuchung und Charakterisierung von adenoviral-produzierter LPS-Trap-Fc im Tiermodell .....</b> | <b>100</b> |
| 4.5.1      | Charakterisierung der LPS-Trap-Fc(Ad) <i>in vitro</i> .....   | 101        |
| 4.5.1.1    | LPS-Trap-Fc(Ad) bildet den TLR4/MD-2 Komplex und bindet LPS.....                                      | 101        |
| 4.5.1.2    | Biologische Aktivität im <i>in vitro</i> -Modell .....  | 102        |
| 4.5.2      | Test der Ad-Trap-Fc <i>in vivo</i> .....  | 103        |
| 4.5.2.1    | Verlauf der LPS-Trap-Fc(Ad) Serumspiegel im Mausmodell .....  | 103        |
| 4.5.2.2    | Rapide Bildung von Antikörpern gegen die LPS-Trap-Fc(Ad) .....  | 105        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.5.2.3    | Einfluss auf die LPS-induzierte Zytokinantwort.....                       | 106        |
| <b>4.6</b> | <b>TLR2-Fusionsproteine.....</b>  | <b>107</b> |
| 4.6.1      | Klonierung von TLR2/1-Fc und TLR2/6-Fc Fusionsproteinen .....             | 107        |
| 4.6.2      | Expression von T2/1- und T2/6-Fc.....                                     | 108        |
| 4.6.3      | Bindung der T2/1- und T2/6-Fc an Lipoteichonsäure .....                   | 109        |
| 4.6.4      | T2/1- und T2/6-Fc hemmen die Lipopeptid stimulierte Zellaktivierung ..... | 110        |
| <b>5</b>   | <b>DISKUSSION.....</b>  | <b>111</b> |
| 5.1        | Modulation der TLR-Signaltransduktion auf Rezeptorebene.....              | 111        |
| 5.2        | Beeinflussung der TLR4-Signaltransduktion durch die LPS-Trap-Fc...        | 112        |
| 5.3        | Untersuchung weiterer Liganden für die LPS-Trap .....                     | 113        |
| 5.4        | TLR4/MD-2-hIgG-Fc als Opsonine für Gram-negative Bakterien .....          | 116        |
| 5.5        | Modifizierung der LPS-Trap-Fc.....  | 120        |
| 5.6        | Charakterisierung und Einsatz der LPS-Trap-Fc(Ad) .....                   | 122        |
| 5.7        | Modulation der TLR2-Signaltransduktion.....                               | 124        |
| <b>6</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>  | <b>128</b> |
| <b>7</b>   | <b>AUSBLICK .....</b>   | <b>130</b> |
| <b>8</b>   | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>   | <b>131</b> |
| <b>9</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>  | <b>134</b> |
| <b>10</b>  | <b>ANHANG .....</b>   | <b>146</b> |
| 10.1       | Publikationsliste .....   | 146        |
| 10.2       | Danksagung .....  | 148        |
| 10.3       | Eidesstattliche Erklärung.....  | 150        |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem zur Infektionsabwehr

Das Immunsystem von Säugetieren ist ein hochdifferenzierter und anpassungsfähiger Apparat zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen. Es besteht aus einer angeborenen und einer adaptiven Komponente, deren Kooperation zum Schutz gegen Infektionen verhilft.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist ein evolutionär altes und hoch konserviertes System. Pflanzen und Tiere verfügen über ähnliche molekulare Module, was auf eine Entstehung vor der getrennten Entwicklung dieser Reiche hinweist [1].

| Modul des angeborenen Immunsystems                 | Sensor                               | Immunantwort   |
|--|--------------------------------------|--|
| Schleimhautepithel                                 | TLRs und NOD Proteine                | Antimikrobielle Peptide<br>Produktion von Muzinen  |
| Phagozyten   | TLRs, Dectine und NOD-Proteine       | Antimikrobielle Peptide<br>Zytokine: TNF, IL-1 $\beta$ und IL-6  |
| Akute-Phase-Proteine und Komplementsystem          | Kollektine, Pentraxine und Ficolline | Lyse und Opsonisierung von Pathogenen<br>Chemotaktische Anlockung von Lymphozyten  |
| Inflammasom  | NALPs und NAIPs                      | Produktion von Mitgliedern der IL-1 Familie<br>Apoptose von infizierten Zellen   |
| NK-Zellen  | ---                                  | Apoptose von infizierten Zellen<br>IFN- $\gamma$ Produktion  |
| Typ-I-IFN induzierte Proteine                      | RIG-I, MDA5, DAI und TLRs            | Induktion der antiviralen Immunabwehr<br>Apoptose von infizierten Zellen   |
| Eosinophile und Basophile Granulozyten, Mastzellen | ---                                  | Kontraktion der glatten Muskulatur<br>Produktion von Muzinen, biogenen Aminen<br>Anregung der Peristaltik<br>Zytokine: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und TNF |

**Abb. 1.1: Systeme des angeborenen Immunsystems**

*Diese Liste ist eine stark vereinfachte Darstellung der einzelnen Module des angeborenen Immunsystems. Die PRRs für die Kontrolle der NK-Zellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten sowie der Mastzellen konnten bisher nicht identifiziert werden.*

*Modifiziert nach [2]*

Dieses System besitzt eine duale Funktion [3]: Einerseits dient es der ersten Abwehr gegen Pathogene, andererseits ist es an verschiedenen physiologischen Prozessen, wie der Gewebsregeneration und der Beseitigung apoptotischer Zellen,

beteiligt. Die Einteilung in Untersysteme spiegelt die einzelnen Stufen der evolutionären Entwicklung wider (Abb. 1.1) [2]. Das Abwehrsystem basiert zum einen auf mechanischen und physiologischen Barrieren wie Epithelien, zum anderen auf keimbahnkodierten Molekülerkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs). Diese spielen eine Schlüsselrolle als Sensoren für Pathogene und Gefahrensignale (siehe 1.2). Das angeborene Immunsystem besitzt folglich schnelle Effektormechanismen, die von körperfremden Molekülstrukturen und Gefahrensignalen ausgelöst werden. Ein Großteil der Pathogene kann dadurch vor Entstehung eines Infektionsherdes beseitigt werden. Durchbricht ein infektiöser Organismus diese ersten Abwehrlinien, wird nach 4 bis 5 Tagen eine adaptive Immunantwort ausgelöst. Diese kooperiert mit dem angeborenen Immunsystem; es findet eine gegenseitige Koordination und Kontrolle statt [2].

### 1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird auch als „spezifische Immunsystem“ bezeichnet. Dies folgt aus der gezielten Erkennung und Beseitigung von Pathogenen durch antigenspezifische Effektorzellen, den T- und B-Lymphozyten. Durch somatische Rekombinationen entsteht eine so gut wie unlimitierte Anzahl verschiedener Klone dieser Zellen, die im Falle einer Infektion spezifisch expandieren und das Pathogen beseitigen.

| Eigenschaften                         | Angeborenes Immunsystem                                     | Adaptives Immunsystem  |
|---------------------------------------|---|--|
| Rezeptoren                            | Im Genom fixiert  | In Gensegmenten kodiert, Genreorganisation nötig                           |
| Mannigfaltigkeit                      | Zellen einer Klasse sind identisch                          | Alle Zellen einer Klasse sind verschieden                                  |
| Erkennung                             | evolutionär konservierte Molekülstrukturen                  | Ausschnitte aus Molekülstrukturen (Peptide, Kohlenhydrate)                 |
| Gedächtnis                            | nein  | ja   |
| Reaktionszeit                         | sofortige Aktivierung von Effekten                          | Verzögerte Aktivierung von Effektorzellen                                  |
| Physikalische und chemische Barrieren | Haut, Epithelien, antimikrobielle Agenzien                  | Lymphozyten in Epithelschicht sezernierte Antikörper auf Epitheloberfläche |
| Humorale Abwehr                       | Komplement, Akute-Phase-Proteine<br>Lysozym, Zytokine       | B-Lymphozyten (Antikörper)   |
| Zelluläre Abwehr                      | Monozyten, Dendritische Zellen,<br>Granulozyten, Mastzellen | T-Lymphozyten  |

**Abb. 1.2: Gegenüberstellung des angeborenen und adaptiven Immunsystems**

Modifiziert nach [4]



Darüber hinaus bilden sich während der adaptiven Immunantwort Gedächtniszellen, die bei einer Reinfektion mit demselben Antigen zu einer deutlich schnelleren und effektiveren Immunantwort führen. Die wesentlichen Unterschiede zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem sind in Abb. 1.2 zusammengefasst.

## 1.2 Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

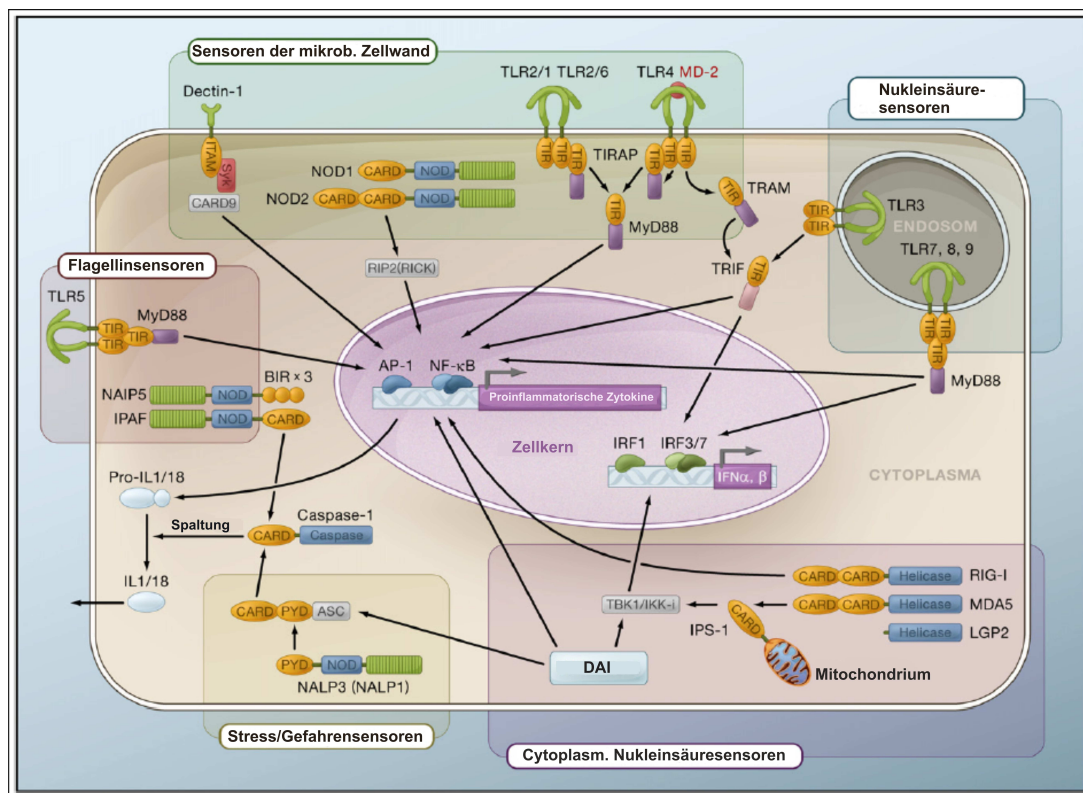
Eine breite Vielfalt an keimbahnkodierten Rezeptoren dient dem angeborenen Immunsystem als Sensor für Gefahren. Im Sinne des erweiterten *Self-non-self*-Modells interagieren diese sogenannten PRRs mit konservierten und für ein Pathogen essentiellen Molekularstrukturen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) [5; 6]. Es gibt aber auch Hinweise, dass körpereigene Molekülstrukturen (*damage associated molecular patterns*, DAMPs), die als Gefahr- oder Alarmsignale z.B. nach Gewebsschäden frei werden, diese Rezeptoren aktivieren [7]. Eine steigende Zahl nachgewiesener körpereigener Liganden unterstützt dieses *Danger*-Modell [8]. Diese Rezeptoren sind auf Zelloberflächen, in intrazellulären Kompartimenten oder sezerniert im Blut bzw. Gewebsflüssigkeiten lokalisiert.

Die PRRs können grob in drei funktionelle Klassen eingeteilt werden: Sezernierte, phagozytierende und signaltransferierende PRRs [4]. Die sezernierten PRRs wirken als Opsonine. Durch die Bindung an mikrobielle Oberflächen werden Pathogene für die Erkennung durch Komplementsystem, NK-Zellen und Phagozyten markiert. Typische Beispiele sind das Mannose-bindende Lektin (MBL), Serum Amyloid Protein (SAP) oder das C-reaktive Protein (CRP), die zu frühen Zeitpunkten einer Infektion im Rahmen der Akuten-Phasen-Reaktion in der Leber produziert werden.

Die zweite Gruppe der PRRs findet sich auf der Oberfläche von Phagozyten und vermittelt die Phagozytose von Mikroorganismen. Der Mannoserezeptor auf Makrophagen, Dectin 1 oder verschiedene Scavenger-Rezeptoren (CD36, CD91, *macrophage scavenger receptor*) erkennen ohne weitere Opsonierung bestimmte mikrobielle Strukturen und vermitteln deren Aufnahme in die Zelle. Nach dem Transport in das lysosomale Kompartiment werden die phagozytierten Partikel dort durch lysosomale Enzyme zerstört.

Die letzte Gruppe der PRRs besitzt die Fähigkeit, nach ihrer Interaktion mit körperfremden oder –eigenen Liganden Informationen über Signalkaskaden in die

Zelle weiterzuleiten und daraufhin durch die Expression verschiedener Gene eine Immunantwort zu koordinieren.



**Abb. 1.3: Erkennung von Gefahr durch signaltransduzierende PRRs**

Signaltransduzierende PRRs wie Toll-like, NOD-like, RIG-like und C-Typ Lektin Rezeptoren sind auf der Oberfläche und innerhalb einer Vielzahl von Zellen zu finden. Im Zusammenspiel erkennen sie eine große Vielfalt von mikrobiellen Signaturen, wie mikrobielle Zellwandbestandteile oder Flagellin, aber auch von Stress- oder Gefahr-induzierten Molekülen. Über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (AP-1, NF- $\kappa$ B, diverse IRFs) wird die körpereigene Abwehr durch die Induktion von Genen, die proinflammatorische Enzyme oder Typ-I Interferone exprimieren, koordiniert. Modifiziert nach [9]

Dieser Gruppe gehören vier verschiedene Rezeptorfamilien an: Die *Toll-like receptors* (TLRs), *nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors* (NLRs), *retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors* (RLRs) und einige C-Typ Lektin Rezeptoren (CLRs) (Abb. 1.3) [9]. Die TLRs befinden sich auf der Plasmamembran und können bakterielle Zellwandkomponenten, virale Proteine und körpereigene Gefahrensignale erkennen (siehe 1.3). Virale und bakterielle Nukleinsäuren werden durch endosomale TLRs erfasst. RLRs und NLRs dienen durch ihre Lokalisation im Cytoplasma als Sensoren für eine intrazelluläre Invasion durch Mikroorganismen. Virale RNA kann durch die RLRs RIG-1, MDA5 und LGP2 [9; 10], virale DNA durch DAI [11] erkannt werden. Mitglieder der NLR-Familie

registrieren intrazellulär bakterielle Zellwandbestandteile (NOD1, NOD2, NALP1, NALP3), Flagellin (IPAF, NAIP5), DNA (viral NALP3, bakteriell ASC) oder RNA (NALP3) [9]. Der Multienzymkomplex NALP3-Inflammasom erkennt darüber hinaus auch nichtpathogene Strukturen wie Natriumurat-Kristalle [12], Aluminium-Adjuvans [13] und körpereigene DNA [14]. Das C-Typ Lektin Dectin 1 ist nicht nur ein endozytierender PRR, sondern kann auch direkt Signale an die Zelle weiterleiten und wird als Korezeptor für TLR2 diskutiert [15; 16].

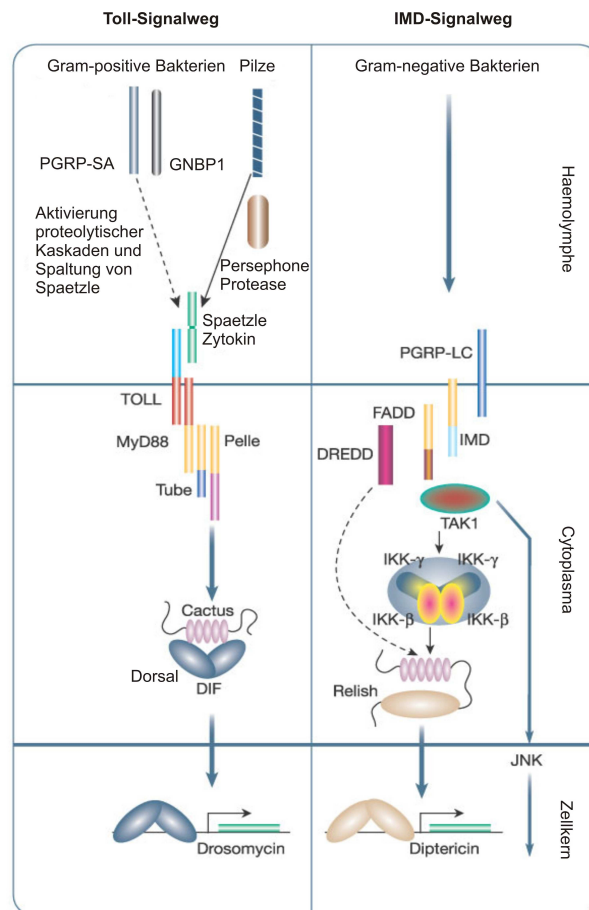
### 1.3 Toll-like Rezeptoren

Die Toll-like Rezeptoren sind die bekannteste und am besten beschriebene Gruppe der PRRs. TLRs sind evolutionär hochkonserviert angefangen vom Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* bis zu den Säugetieren.

#### 1.3.1 Drosophila Toll

Das ursprüngliche Toll-Protein wurde 1984 zunächst als essentielles Genprodukt für die dorsoventrale Entwicklung des Embryos in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert [17]. Erst wesentlich später wurde seine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen Gram-positive Bakterien und Pilze erkannt [18]. *Drosophila* Toll ist wie sein humanes Homolog ein Typ-I Transmembranrezeptor. Durch Bestandteile Gram-positiver Bakterien und Pilze werden proteolytische Kaskaden ausgelöst, die zur Spaltung des *Spätzle* Proteins führen. Gespaltenes *Spätzle* bindet als Dimer an die Toll Ektodomäne. Über die cytoplasmatische TIR-Domäne wird das *Drosophila* Homolog von *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) rekrutiert. Dieses wiederum rekrutiert die Adapterproteine *Tube*, *Pelle* und *Cactus*, was letztendlich zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B-ähnlichen Transkriptionsfaktoren *Dorsal* oder DIF (*Dorsal-related immunity factor*) führt.

Die Erkennung von Gram-negativen Bakterien erfolgt über den IMD (*immune deficiency*)-Signalweg. Das Immunsystem von *Drosophila* ist folglich in der Lage, zwischen verschiedenen Pathogenen zu unterscheiden und beruht auf PRRs.



**Abb. 1.4: Toll- und IMS-Signalwege in Drosophila**

In *Drosophila* wird die Produktion antimikrobieller Peptide (z.B. Drosomycin oder Diptericin) von 2 Signalkaskaden reguliert. Pathogen-bindende Proteine wie das peptidoglycan-recognition protein (PGRP-SA) oder Gram-negative bacteria binding protein (GNBP1) aktivieren proteolytische Kaskaden, die in der Spaltung des Proteins Spaetzle münden. Gespaltenes Spaetzle aktiviert Toll, das nachfolgend die Adapter MyD88 und Tube rekrutiert, die wiederum die Kinase Pelle aktivieren. Durch die Phosphorylierung und den Abbau von Cactus, können die Transkriptionsfaktoren DIF und/oder Dorsal in den Zellkern translozieren.

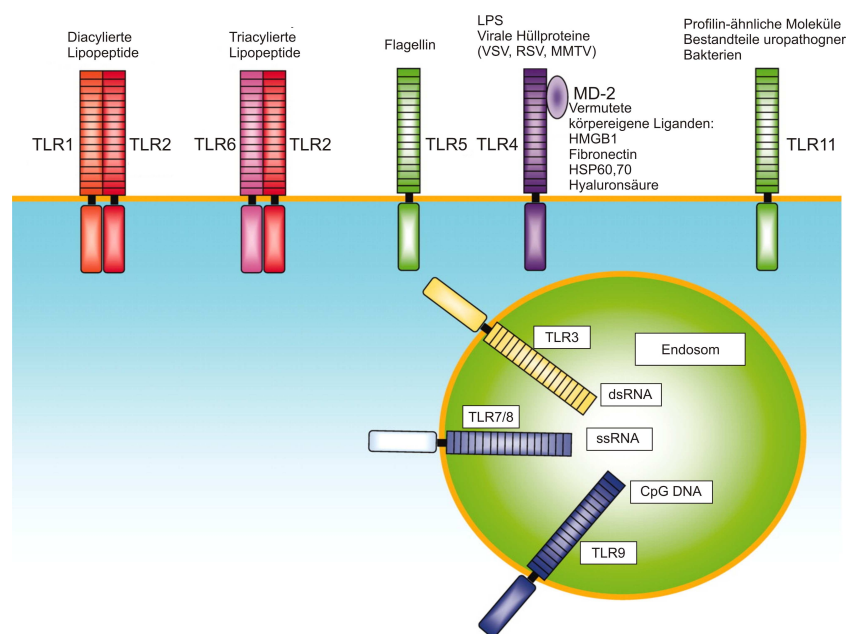
Gram-negative Infektionen werden durch PGRP-LC erkannt, das den IMD-Signalweg aktiviert. IMD bindet das Protein FAS-associated death domain (FADD), welches mit der Caspase death-related ced-3/Nedd-2-like protein (DREDD) interagiert. Diese schneidet Relish, nachdem es durch einen IKK-Komplex phosphoryliert worden ist. Das Rel-Fragment wandert in den Kern und reguliert dort die Gentranskription.

Modifiziert nach [19]

### 1.3.2 Toll Proteine der Wirbeltiere

Nach der Entdeckung der Rolle von Toll in der Immunantwort von *Drosophila melanogaster* konnte schon kurze Zeit später ein humanes Homolog von *Drosophila* Toll kloniert und charakterisiert werden [20]. Die Funktion dieses Toll-like Rezeptors, der heute als TLR4 bekannt ist, wurde erst ein Jahr später entdeckt: Mausstämme mit Mutationen im *Tlr4* Gen waren resistent gegen einen LPS-induzierten Endotoxinschock, zeigten aber gleichzeitig eine hohe Anfälligkeit für Infektionen

durch Gram-negative Bakterien [21]. Bis zum heutigen Tag sind 13 TLRs (10 im Menschen, 12 in der Maus) identifiziert. Im Gegensatz zu *Drosophila* Toll können TLRs direkt durch Fremdmoleküle aktiviert werden. TLRs werden zusammen mit IL-1R, IL-18R und IL-33R aufgrund ihrer homologen cytoplasmatischen Domänen zur Interleukin-1-Rezeptor/Toll-like-Rezeptor Superfamilie gezählt. Diese charakteristische Toll/Interleukin-1 (TIR) Domäne ist essentiell für die Signalübertragung [22]. Während der extrazelluläre Teil des IL-1R aus drei Immunglobulindomänen besteht, sind für TLRs 16-28 LRR (*leucine rich repeats*)-Motive mit jeweils 24-29 Aminosäuren charakteristisch [23]. Auf der Basis von Sequenzhomologien können die TLRs in weitere Subgruppen eingeteilt werden. So dienen die eng verwandten TLR1, TLR2 und TLR6 als Sensor für Lipoproteine, während TLR7, TLR8 und TLR9 Nukleinsäuren zu ihren Liganden zählen.



**Abb. 1.5: TLRs und ihre Liganden**

TLR2 erkennt in Zusammenspiel mit TLR1 oder TLR6 bakterielle Lipopeptide. Weitere bakterielle und fungale Liganden wie Mannan, LTA oder Zymosan werden diskutiert. TLR5 dient als Sensor für Flagellin, dem Filamentprotein bakterieller Geißeln (Flagellen). TLR4 ist im Zusammenspiel mit MD-2 der Rezeptor für LPS. Darüber hinaus erkennt es Hüllproteine diverser Viren, wie des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), des Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) und des Maus-Mammatumortumor-Virus (MMTV). Auch körpereigene Liganden wie das High mobility group box 1 protein (HMGB1), Fibronectin, Abbauprodukte der Hyaluronsäure, Heat Shock Proteine (HSP) werden diskutiert. Das in der Maus exprimierte TLR11 erkennt Profilin-ähnliche Moleküle von *Toxoplasma gondii* und Bestandteile uropathogener Bakterien.

Endosomale TLRs erkennen Nukleinsäuren: TLR3 registriert Doppelstrang RNA (dsRNA), TLR7 und TLR8 Einzelstrang-RNA (ssRNA) von Viren. TLR9 hingegen erkennt die CpG-Motiv reiche DNA von Bakterien.

Modifiziert nach [24]



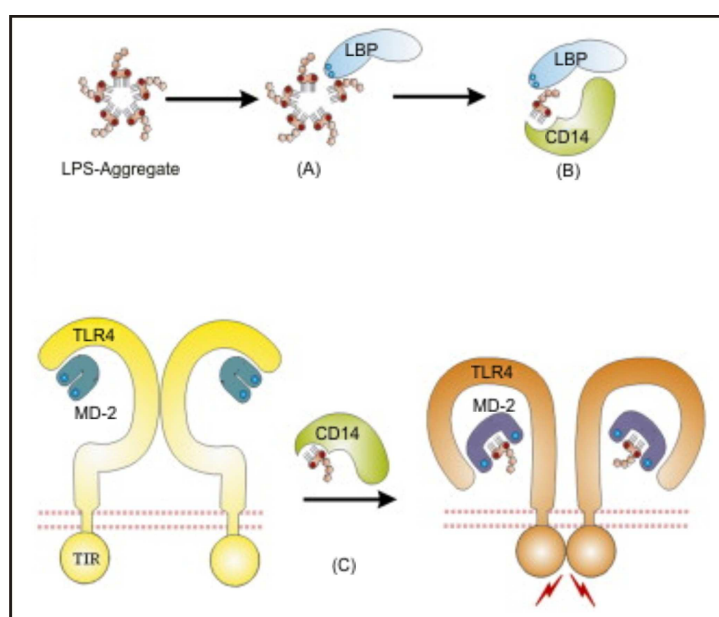
*Tlrs* werden hauptsächlich in Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen exprimiert. Aber auch in B-Zellen, bestimmten T-Zellen, Fibroblasten und Epithelzellen konnten TLRs identifiziert werden [25]. Abhängig von ihren Liganden sind sie auf der Zelloberfläche (TLRs 1, 2, 4, 5, 6) oder in intrazellulären Kompartimenten (Endosom, TLRs 3, 7, 8, 9) (Abb. 1.5) lokalisiert.

### 1.3.2.1 LPS-Erkennung über TLR4/MD-2

Die Identität des LPS-Rezeptors blieb lange Zeit ungeklärt und war aufgrund seiner Schlüsselrolle in Gram-negativen Infektionen das Ziel intensiver Forschung. Die Entdeckung des *Lipopolysaccharide-binding protein* (LBP) lieferte erste Hinweise auf den Mechanismus [26]. Es wird vermutet, dass dieses Akute-Phase-Protein über seine kationischen Aminosäurenreste LPS-Aggregate auflöst und als erster Bindungspartner von LPS im Organismus agiert (Abb. 1.6, A) [27]. Das Glykoprotein CD14, welches sowohl in löslicher Form als auch als membranständiger Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerter Rezeptor im Organismus auftritt, bindet den LBP/LPS-Komplex und bekommt das Endotoxin auf diese Weise übertragen (Abb. 1.6, B) [28]. Einige Zeit wurde CD14 als der Säugetier-LPS-Rezeptor bezeichnet, eine Signaltransduktion ist aber aufgrund der fehlenden Cytoplasma-Domäne nicht möglich [29].

Die Mausstämme C3H/HeJ und C57BL/10ScCr sind trotz funktioneller LBP und CD14 unempfindlich gegen LPS. 1998 konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im *Lps* Gen der C3H/HeJ-Maus einer nicht-synonymen Mutation im *Tlr4* Gen entspricht bzw. das *Tlr4* Gen der C57BL/10ScCr-Maus vollständig fehlt [21]. Das kürzlich zuvor entdeckte humane Homolog des *Drosophila* Toll war folglich für die LPS-Signalübertragung verantwortlich und wurde als TLR4 bezeichnet. Nachdem festgestellt worden war, dass Zellen, die nur mit TLR4 transfiziert waren, nicht auf LPS reagierten, konnte 1999 das *myeloid differentiation protein 2* (MD-2) als eine weitere wichtige Komponente der LPS-Erkennung identifiziert werden [30]. Die Bindung von LPS über seine Lipidkomponente Lipid A erfolgt ausschließlich über MD-2 [31; 32]. Die Affinität dieser Bindung wird im Komplex mit TLR4 deutlich verstärkt, während TLR4 alleine kein LPS bindet [33]. Da TLR4 in MD-2-defizienten Zellen im Golgi-Apparat verbleibt und nicht an die Zelloberfläche gelangt, scheint sich der TLR4/MD-2 Komplex bereits im endoplasmatischen Retikulum zu bilden und MD-2 als Chaperon zu wirken [34; 35]. Nicht LPS-gebundenes lösliches MD-2 verliert

unter physiologischen Bedingungen durch die Bildung von Oligomeren, die nicht mehr LPS binden können, schnell seine Aktivität [36]. TLR4/MD-2 kann folglich als LPS-Rezeptorkomplex bezeichnet werden. Die Übertragung des LPS von CD14 auf den TLR4/MD-2 Komplex und die folgende Homodimerisierung von TLR4 stellt somit den letzten Schritt zur LPS-Signaltransduktion dar (Abb. 1.6, C).



**Abb. 1.6: Mechanismus der LPS-Erkennung durch TLR4/MD-2**

LPS-Aggregate werden durch das Serumprotein LBP aufgespalten. Einzelne LPS-Moleküle werden anschließend von LBP auf lösliches oder membranständiges CD14 übertragen. Das wiederum transferiert LPS auf den TLR4/MD-2-Rezeptorkomplex. Während MD-2 als LPS-Bindungspartner fungiert, stabilisiert TLR4 den Bindungskomplex und löst über eine Rezeptor-Dimerisierung die Signalkaskade aus.

Kürzlich konnte die Natur des TLR4/MD-2 Komplexes durch die Darstellung seiner Kristallstruktur vollständig aufgeklärt werden [37]. Die vier Acylketten des TLR4-Antagonisten Eritoran besetzen vollständig die hydrophobe Höhle von MD-2, das wiederum mit der konkaven Seite von TLR4 im Bereich der N-terminalen und zentralen Domänen assoziiert ist [37]. Die Bindung von LPS mit 6 Acylketten induziert demnach eine Konformationsänderung von MD-2, die die Bildung von TLR4/MD-2 Heterotetrameren begünstigt und über die Dimerisierung der TIR-Domänen zur Signalauslösung führt.

Alternativ wird raues LPS, das über keine O-Polysaccharidkette oder Kernoligosaccharide verfügt, CD14 unabhängig erkannt und löst ausschließlich den MyD88-abhängigen Signalweg (siehe 1.4.1) aus [38].

### 1.3.2.2 TLR2

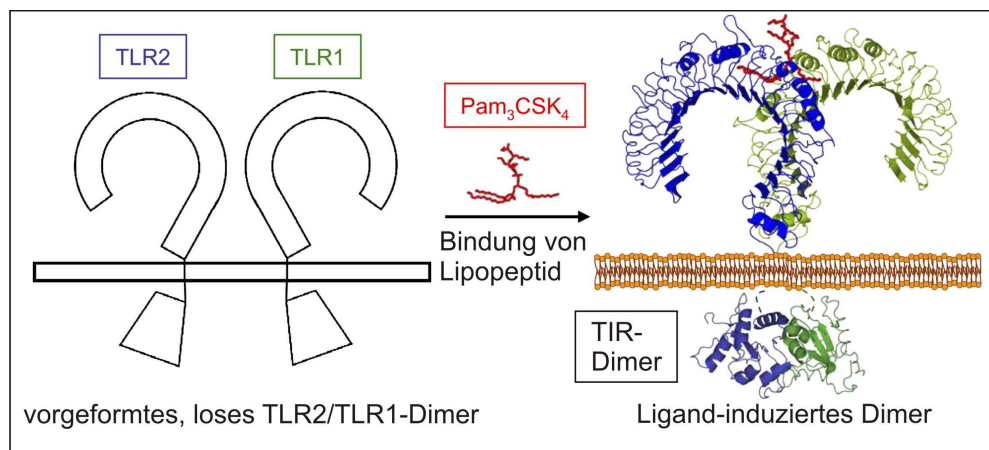
Für TLR2 ist eine breite Palette an Liganden aus Bakterien, Pilzen und Protozoen beschrieben. Als gesichert gilt heute nur die Funktion als Sensor für Lipoproteine und Lipopeptide unterschiedlicher Herkunft [39]. Die artifiziellen Lipopeptide Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub>, FSL-1 und Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> werden als Standardstimulantien für TLR2 verwendet, MALP-2 (*macrophage activating lipopeptid 2*) aus *Mycoplasma salivarium* ist der einzige fundierte natürliche Ligand für TLR2. Die beschriebene Aktivierung durch bakterielle Peptidoglykane [40; 41], lässt sich auf die Verunreinigung mit Lipoproteinen zurückführen [42]. Auch Lipoteichonsäure (LTA) ist als Ligand von TLR2 [40] in die Diskussion geraten. So zeigten LTA-Fractionen aus Lipopeptid-defizienten *S. aureus* eine 100-fache schwächere Potenz TLR2 zu aktivieren, als Fractionen aus WT-Stämmen [43]. Des Weiteren wird noch die Aktivierung durch Lipoglykane aus Mykobakterien [44; 45] und Zymosan [46], ein Bestandteil der Zellwand von Hefepilzen, beschrieben.

Das große Spektrum an Liganden für TLR2 lässt sich über zwei Mechanismen erklären. TLR2 bildet mit den strukturell eng verwandten TLR1 und TLR6 Heterodimere. Über diese Heterodimere scheint TLR2 zwischen di- und triacylierten Liganden zu unterscheiden. So erfuhren Makrophagen TLR6-defizienter Mäuse nur einen schwachen Stimulus durch diacylierte, wohl aber einen starken auf triacylierte Lipopeptide [47]. TLR1-defiziente Makrophagen verhalten sich *vice versa* [48]. Diese Komplexe liegen bereits auf der Zelloberfläche vor und werden nicht erst durch die Bindung eines Liganden induziert [49]. Die Darstellung der Kristallstruktur des humanen TLR1/TLR2-Komplexes lieferte weitere Hinweise auf die Modi der Ligandenbindung [50]. In diesem Modell bewirkt die Bindung von Lipopeptiden an die konvexe Außenseite eine Umlagerung dieser losen, vorgeformten Komplexe zu stabileren Di- oder Multimeren. Durch die räumliche Annäherung der TIR-Domänen kommt es schließlich zur Signalauslösung (Abb. 1.7) [50]. Da TLR2 bestimmte Lipopeptide auch unabhängig von TLR1 und TLR6 erkennt, wird darüber hinaus die Bildung von TLR2-Heterodimeren diskutiert [51].

Ein weiterer Grund für das unterschiedliche Ligandenspektrum ist die Rolle von diversen Akzessorproteinen. CD14 scheint für die Übertragung von Lipopeptid-Liganden auf TLR2 bedeutsam zu sein [52]. CD14-defiziente Makrophagen reagieren im Gegensatz zu ihren WT-Äquivalenten nur schwach auf Zymosan [46]. Der Scavenger-Rezeptor CD36 ist wichtig für die effiziente Signalübertragung von R-



MALP-2 und LTA-Stimuli, aber nicht für S-MALP-2, Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub>, Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> und Zymosan [53]. Für die effiziente Immunantwort gegen den Pilz *Coccidioides posadasii* ist eine Kooperation von TLR2 mit dem C-Typ Lektin Dectin-1 notwendig [54]. Die genaue Rolle dieser Akzessorproteine und die Art der Interaktion mit TLR2 sind aber weiterhin unklar.



**Abb. 1.7: Modell der Ligand-induzierten Heterodimerisierung von TLR2 und TLR1**

TLR2 und TLR1 liegen als schwach assoziierter Komplex auf der Zelloberfläche vor. Die genaue Natur des losen Dimers ist noch unbekannt. Die Bindung von Liganden induziert einen räumlich näheren Rezeptorkomplex, der über die Dimerisierung der TIR-Domänen die Signaltransduktion auslöst.

Modifiziert nach [50]

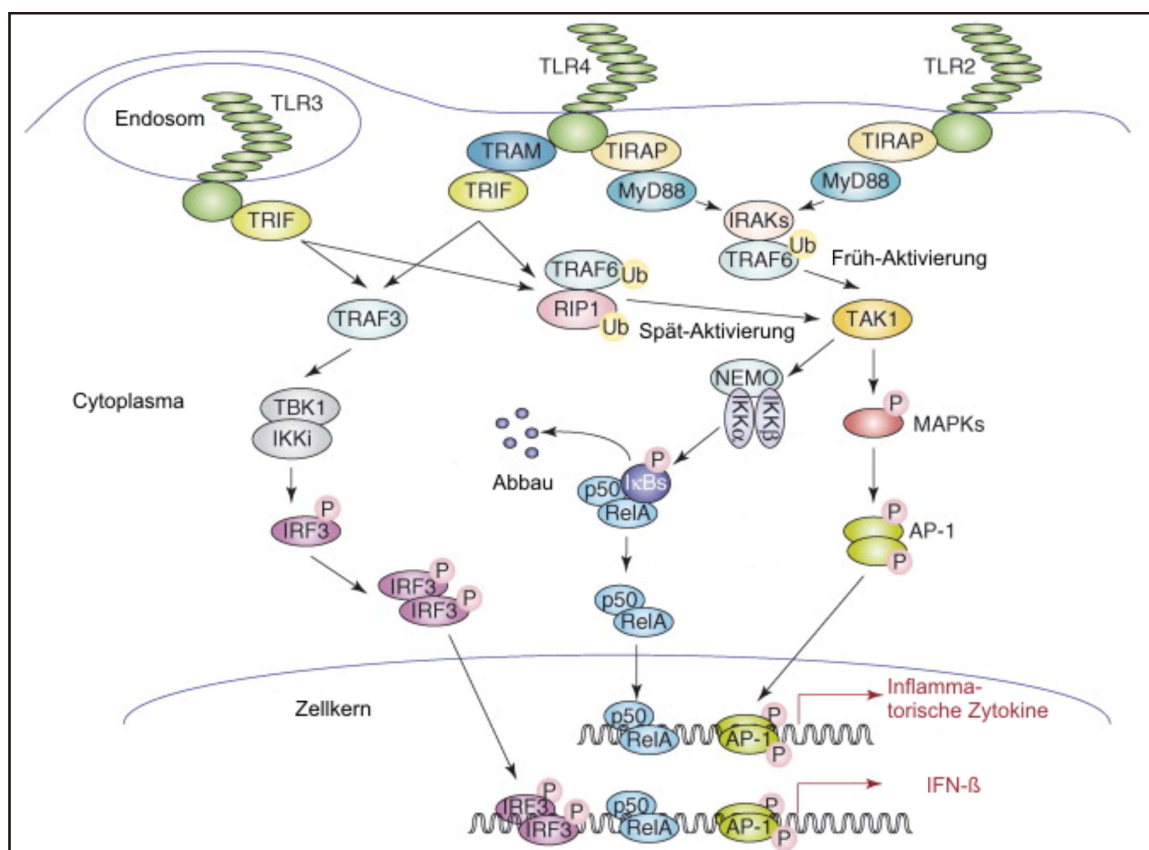
## 1.4 TLR Signaltransduktion

Nach der Aktivierung der TLRs kommt es zu einer Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren und durch die räumliche Nähe ihrer cytoplasmatischen TIR-Domänen zur Auslösung der Signaltransduktion. Dies führt zur Induzierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen des angeborenen Immunsystems. Gleichzeitig setzt die Signalübertragung über TLRs kostimulatorische Moleküle frei, die unverzichtbar für die Induktion der adaptiven Immunantwort sind.

### 1.4.1 MyD88-abhängige Signaltransduktion

Den zuerst entdeckten Signalweg bezeichnet man nach seinem primären Adaptermolekül als Myd88-abhängigen Signalweg, welchen alle TLRs außer TLR3 nutzen [55] (Abb. 1.8). MyD88 assoziiert über seine TIR-Domäne mit der cytoplasmatischen Domäne der TLRs. An der Signaltransduktion von TLR2 und

TLR4 ist noch ein weiteres Adaptormolekül, das *TIR domain-containing adaptor molecule* (TIRAP, auch *MyD88 adaptor-like*, Mal) beteiligt, welches als Verbindung zwischen den TIR-Domänen des Rezeptors und MyD88 dient [56; 57]. Über eine N-terminale *death domain* (DD) bindet MyD88 wiederum an die DD von Proteinkinasen der *IL-1 receptor-associated kinase*-Familie (IRAK1, IRAK2, IRAK4 und IRAK-M) [58]. IRAK4 wird initial aktiviert und phosphoryliert wiederum IRAK1. Nach ihrer Phosphorylierung dissoziieren IRAK4 und -1 von MyD88 und interagieren mit der Ubiquitin-Ligase TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*). Zusammen mit weiteren Proteinen führt dies zur Polyubiquitinylierung verschiedener Zielproteine, wie TRAF6 selbst und des NF- $\kappa$ B-Modulators NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modifier*, IKK $\gamma$ ) [59; 60]. Diese wiederum rekrutieren einen Proteinkinasekomplex bestehend aus TAK1 (*transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*) und TABs (*TAK1 binding proteins*, TAB1, TAB2, TAB3) [59]. Dieser Komplex aktiviert daraufhin zwei weitere Signalwege: Zum einen den IKK (I $\kappa$ B Kinase)-Komplex, was letztlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B p50/RelA führt. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert die Expression vieler für das Entzündungsgeschehen und die Immunantwort bedeutender Gene. So tragen z.B. die Gene für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 wie auch für die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86  $\kappa$ B-Erkennungssequenzen in ihren Promotoren [61]. Zum anderen werden *mitogen-activated protein kinases* (MAPK)s aktiviert. Diese Familie umfasst die *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase* (JNK), die *extracellular signal regulated kinase* (ERK) und die p38-MAPK und aktiviert den Transkriptionsfaktor *activator protein 1* (AP-1), welcher die Expression zahlreicher Gene reguliert. Darüber hinaus wird über TRAF6 die Aktivierung von *IFN regulatory factors* (IRF5, IRF7) durch den MyD88-abhängigen Weg induziert [62]



**Abb. 1.8: Signaltransduktion über TLRs**

TLR4 aktiviert sowohl die MyD88- als auch die TRIF-abhängige Signaltransduktion. TIRAP und TRAM dienen als Adaptermolekül für MyD88 (nur TLR2 und TLR4) bzw. TRIF (nur TLR4). MyD88 rekrutiert TRAF6 und Mitglieder der IRAK-Familie und aktiviert so den TAK1-Komplex. Dieser wiederum aktiviert den IKK-Komplex, der aus IKKα, IKKβ und NEMO besteht und die Phosphorylierung von IκB katalysiert. Durch den Abbau von IκB kann das NF-κB RelA-p50 Heterodimer in den Kern translozieren. Parallel aktiviert der TAK1-Komplex MAPKs-Signalwege die zur Phosphorylierung und Aktivierung von AP-1 führen. NF-κB und AP-1 kontrollieren die Entzündungsantwort durch die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen.

Die TRIF-abhängige Signaltransduktion wird exklusiv von TLR3 und TLR4 aktiviert. TRIF rekrutiert sowohl TRAF3 als auch TRAF6. TRAF3 interagiert mit TBK1 und IKKi, welche den Transkriptionsfaktor IRF3 phosphorylieren. Nach seiner Dimerisierung transloziert IRF3 in den Zellkern, wo er die Transkription von Typ I Interferon-Genen reguliert. Die Interaktion von TRIF mit TRAF6 führt zur verzögerten Aktivierung des NF-κB-Signalweges.

Modifiziert nach [63]

#### 1.4.2 TRIF-abhängige Signaltransduktion

Untersuchungen an Makrophagen aus MyD88-defizienten Mäusen zeigten, dass LPS immer noch NF-κB und MAPKs aktivieren konnte [64]. Diese Aktivierung ist gegenüber WT-Zellen verzögert. Darüber hinaus kann LPS die IFN-β Produktion unabgänglich von MyD88 induzieren [65]. Diese Studien wiesen darauf hin, dass zumindest für TLR3 und TLR4 ein MyD88-unabhängiger Signalweg existiert. Als erster Adapter dieses Signalwegs konnte *TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β* (TRIF, auch *TIR domain containing adaptor molecule-1*, TICAM-1) identifiziert

werden [66; 67]. Aufgrund der schlechten Interaktion von TRIF mit der TIR-Domäne von TLR4 vermittelt der Adaptor *TRIF related adaptor molecule* (TRAM, auch *TIR domain containing adaptor molecule-1*, TICAM-2) die Bindung der beiden Moleküle [68; 69].

TRIF bindet über N-terminale TRAF6-Bindungsmotive direkt an TRAF6 [70], während C-terminale Bindungsmotive für die Interaktion mit RIP1 (receptor-interacting protein-1) verantwortlich sind [71]. Polyubiquitinyliertes RIP1 bildet einen Komplex mit TRAF6 und TAK1 und führt so zu der beobachteten Spät-Aktivierung von NF- $\kappa$ B [64; 72].

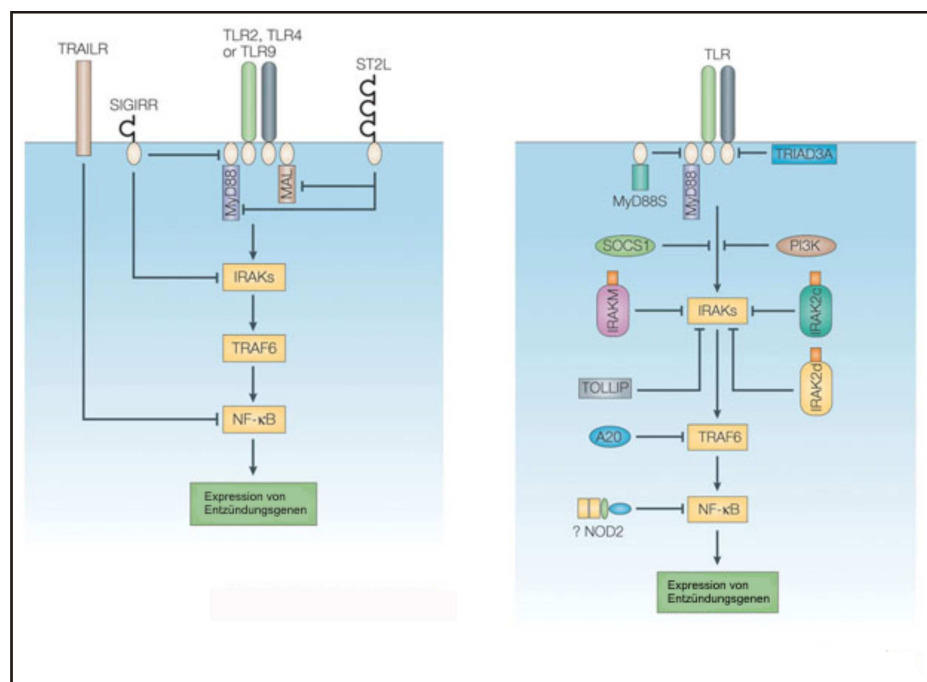
Darüber hinaus wird über den MyD88-unabhängigen Signalweg die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 kontrolliert, welcher die Expression IFN- $\beta$  abhängiger Gene induziert. Dies geschieht über die Rekrutierung von TBK1 (*TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator binding kinase-1*). Bisher ist nicht vollständig geklärt, ob die Interaktion zwischen TRIF und TBK1 indirekt oder direkt erfolgt, es konnte aber gezeigt werden, dass TRAF3 beide Moleküle binden kann und als Verbindungselement dient [73]. Darüber hinaus interagiert TRAF3 noch mit IKKi. Der Komplex aus TBK1/IKKi wiederum phosphoryliert IRF3 und führt nach Dimerisierung zu dessen Translokation in den Nukleus.

Neueste Daten zeigen, dass die zwei möglichen Signalwege von TLR4 sequentiell aktiviert werden [74]: Zunächst induziert TLR4 auf der Plasmamembran den TIRAP/MyD88-Signalweg. Erst nach der Endozytose des Rezeptors wird anschließend der TRAM/TRIF-Signalweg aus dem frühen Endosom heraus aktiviert.

### 1.4.3 Negativregulierung der TLR-Signaltransduktion

Da die Aktivierung von TLRs eine starke Immunantwort hervorruft, sind hemmende Signalwege essentiell, um den Organismus vor generalisierter Entzündung wie der Sepsis zu schützen. Diese Hemmung erfolgt auf verschiedenen Ebenen. So konkurrieren die Transmembranproteine ST2L und SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1R-related molecule*) mit TLRs um MyD88 [75; 76], während TRAILR (*TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*) I $\kappa$ B $\alpha$  stabilisiert und so die Kerntranslokation von NF- $\kappa$ B hemmt [77] (Abb. 1.9, linkes Bild). Die Splice-Varianten MyD88s, IRAK2c und IRAK2d hemmen aufgrund ihrer fehlenden funktionalen Domänen MyD88 und IRAK [78; 79]. IRAK-M verhindert die Dissoziation der IRAKs von MyD88 [80]. SOCS1 (*suppressor of cytokine signalling 1*) hemmt wahrscheinlich

über IRAK1 die TLR-Signalkaskade [81; 82]. TRIAD3A ubiquitinyliert TLRs und führt so zu deren Abbau [83]. PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) moduliert die TLR ausgelöste Zytokinproduktion unter anderen über die Regulierung von GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) [84; 85]. A20 kann als deubiquitinierendes Enzym Ubiquitin von TRAF6 entfernen und so die Signalweiterleitung verhindern [86]. Über die hemmende Rolle von NOD2 auf NF- $\kappa$ B existieren hingegen widersprüchliche Daten [87; 88] (Abb. 1.9, rechtes Bild).



**Abb. 1.9: Hemmung der TLR4-Signaltransduktion**

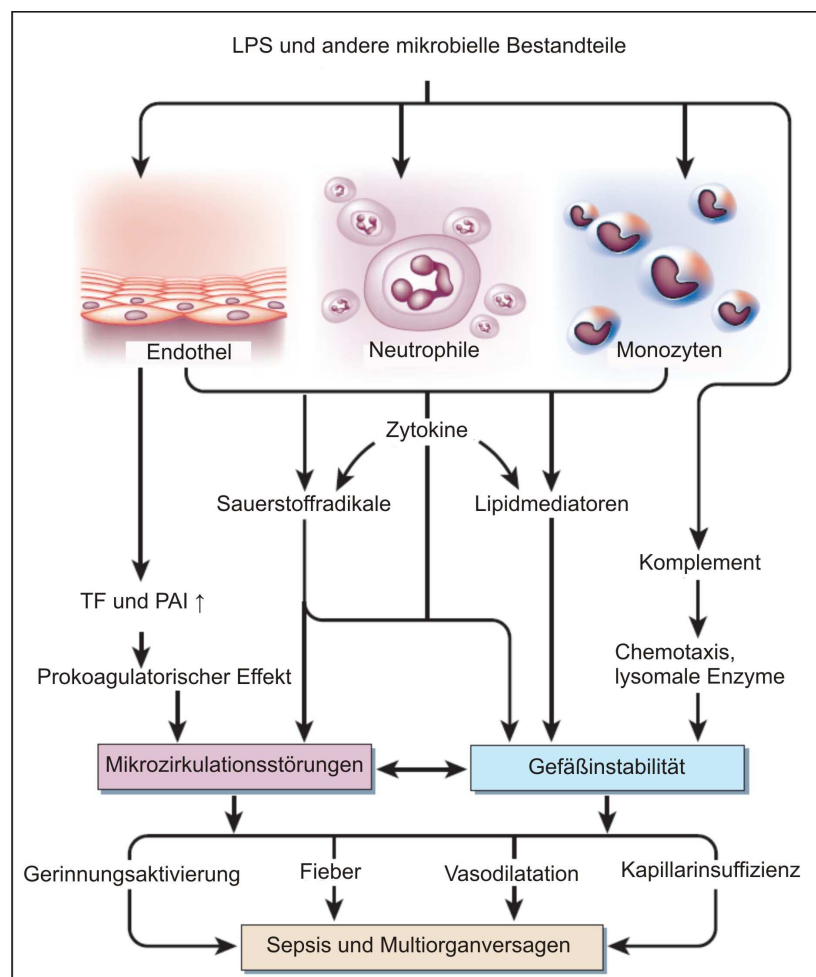
Modifiziert nach [89]

Die TLR-Signaltransduktion kann aber auch durch direkte Hemmung auf Rezeptorebene erreicht werden. So interagiert der *Radioprotective 105* (RP105)/MD-1-Komplex mit TLR4/MD-2 und verhindert so die Bindung an LPS [90]. Außerdem konnten natürlich vorkommende lösliche TLR2 und TLR4 identifiziert werden, die als Kompetitoren für membranständige Rezeptoren wirken könnten (siehe 1.6.3.1).

## 1.5 Bedeutung der TLRs für den Pathomechanismus von Infektionskrankheiten

Die Bedeutung von LPS für Infektionskrankheiten wurde bereits in den 1960er Jahren erkannt [91]. Aber erst mit der Entdeckung der TLRs als Rezeptoren für

bakterielle Bestandteile konnten die molekularen Mechanismen von infektiösen Krankheiten erklärt werden [21; 41]. PAMPs stimulieren die Immunzellen des Wirtes über TLRs und folglich wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Diese lebensnotwendige, lokale Reaktion gerät bei einer Überflutung des Organismus mit Pathogenen außer Kontrolle und wandelt sich zu einem generalisierten Entzündungssyndrom, der Sepsis. Als Sepsis wird ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) mit nachgewiesener Infektion bezeichnet [92].



**Abb. 1.10: Pathomechanismen des septischen Schocks**

LPS und andere mikrobielle Bestandteile aktivieren parallel mehrere Kaskaden, die letztlich zum septischen Schock führen. Die Kombination aus unzureichendem peripheren Gefäßdruck und Mikrozirkulationsstörungen führen zu Hypoperfusion, unzureichender Sauerstoffversorgung und folglich zum Multiorganversagen.

Modifiziert nach [93]

TLR2 und TLR4/MD-2 spielen abhängig vom Erreger aufgrund ihres Ligandenprofils (siehe 1.3.2) eine Schlüsselrolle in der Auslösung einer bakteriellen Sepsis. Die überschießende Aktivierung der TLRs führt zu einem „Zytokinsturm“.



Dieser bewirkt die unkontrollierte Aktivierung weiterer Immun- und Endothelzellen. Dadurch wird das plasmatische Kaskadensystem, zu dem das Gerinnungssystem die Komplementkaskade und das Kallikrein-Kinin-System zählt, ausgelöst [94]. Dies hat einen Verlust der Homöostase dieser einzelnen Systeme zur Folge. Durch disseminierte vasale Gerinnung verstopfen Blutgerinnsel die Kapillargebiete lebenswichtiger Organe und führen so zu Mikrozirkulationsstörungen. Komplementfaktoren und das Kallikrein-Kinin-System fördern die weitere Chemotaxis, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und die Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Abb. 1.10).

Diese unkontrollierten Entzündungsvorgänge münden in Hypoperfusion, Hypoxie und Gewebsschäden. In den schlimmsten Fällen führt dies zu Multiorgandysfunktion (MODS) und –versagen (MOF), die abhängig von dem Schweregrad in 20% bis 70% der Fälle zum Tod führen [95].

Die Rolle der TLRs bleibt aber nicht auf Infektionskrankheiten beschränkt, sondern erstreckt sich auf eine Vielfalt von Erkrankungen, die mit einer Entzündung assoziiert sind. So konnte der Einfluss von TLRs auf den Pathomechanismus der Diabetes [96], der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, der Artherosklerose und verschiedenen Leber-, Nieren und Lungenkrankheiten nachgewiesen werden [97].

## **1.6 Möglichkeiten der Beeinflussung der TLR Signaltransduktion**

### **1.6.1 Neutralisierung von LPS**

Da LPS in der Gram-negativen Sepsis zu Beginn einer folgenreichen Kaskade steht, wurden in den vergangenen Jahren unterschiedliche Strategien verfolgt, dieses möglichst früh nach der Diagnose aus dem Kreislauf zu entfernen. Klinische Studien mit spezifischen Antiendotoxin Antikörpern, die sich gegen Lipid A (HA-1A, Centocor) oder Kernoligosaccharide (J5, Xoma) richteten, verliefen nicht eindeutig, brachten aber keinen Gesamtüberlebensvorteil [95; 98; 99]. Eine Entfernung des LPS über extrakorporale Endotoxinadsorber über 4 Tage hinweg erbrachte ebenfalls keine Verbesserung des Krankheitsbildes [100]. Anti-CD14 Antikörper führten nur im Tiermodell nicht aber in klinischen Studien zu verminderter Letalität [101]. Ein Eliminationsweg von LPS verläuft über Lipoproteine wie HDL [102; 103]. Da die Bindung von Endotoxin mit dem Phospholipidgehalt von HDL korreliert [104], wurde in Tierexperimenten erfolgreich versucht, mit der Applikation von

Phospholipidemulsionen LPS-Effekte zu reduzieren [105]. Im Einsatz am Patienten konnten wiederum keine positiven Auswirkungen auf das klinische Ergebnis erzielt werden [106]. Untersuchungen mit LPS bindenden Peptiden, wie *bactericidal/permeability-increasing protein* (BPI), Cathelicidinen (LL-37) oder *limulus anitlipopolysaccharid factor* (LALF), zeigten das Potential LPS-Effekte zu hemmen [106]. Aussagekräftige klinische Studien stehen aber bisher aus. Der Einsatz von LPS-Antagonisten erscheint lediglich in der Frühphase einer Sepsis sinnvoll, wenn die Entzündung von mikrobiellen Produkten getragen wird. Die Effekte der genannten Strategien sind deshalb durch ihre Fokussierung auf LPS v.a. im fortgeschrittenen Entzündungsgeschehen limitiert.

### 1.6.2 Modulation der Signaltransduktion auf Rezeptorebene

Die in 1.6.1 aufgeführten Behandlungsansätze zeigen, dass reine Anti-LPS-Strategien zur Behandlung von komplexen Entzündungssyndromen nicht effektiv sind. Ein direkter Eingriff auf Rezeptorebene erscheint sinnvoller, da hier ein wesentlich breiteres Spektrum an Liganden beeinflusst werden könnte als bei der selektiven Hemmung von LPS. Die postulierten Ligandenspektren von TLRs stützen diese Hypothese [63; 107-109]. TLR4-Antagonisten befinden sich zurzeit in klinischen Phase-III-Studien (TAK 242, E5565 (Eritoran)). Während TAK242 die Signalauslösung nach LPS-Bindung an TLR4 verhindert, antagonisiert das Lipid A-Analogon E5565 direkt die Bindung von LPS an TLR4/MD-2 [97]. Ein weiterer Ansatzpunkt stellt die kompetitive Hemmung durch lösliche Rezeptoren dar. Mit diesem könnte im Gegensatz zu TLR4-Antagonisten auch eine potentielle MD-2-unabhängige Rezeptoraktivierung gehemmt werden.

### 1.6.3 Lösliche Rezeptoren

#### 1.6.3.1 Natürlich vorkommende lösliche Rezeptoren

Lösliche Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle als Regulator in bestimmten Krankheitszuständen. Bis zum heutigen Tag konnte eine große Anzahl an löslichen Zytokinrezeptoren - z.B. sIL-1RI und -II [110], sIFN- $\gamma$ R [111], sTNFRI und II [112]- aber auch an anderen Rezeptoren, wie z.B. sGM-CSFR [113] oder sLDLR [114], identifiziert werden. Diese entstehen entweder durch alternatives Spleißen der RNA oder durch proteolytische Spaltung eines Rezeptors von der Zellmembran [115].



Lösliche Rezeptoren bestehen üblicherweise aus der Extrazellulardomäne des Membran-gebundenen Rezeptors und behalten dadurch dessen Fähigkeit, Liganden zu binden. Sie können sowohl positiv als auch negativ modulierend auf eine Immunreaktion wirken. Während sIL-1RI und sIL-1RII über die Bindung von IL-1 hemmend in das IL-1 Rezeptorsystem eingreifen [115], kann löslicher IL-6R in Verbindung mit Glykoprotein 130 in Zellen eine Signaltransduktion induzieren, obwohl diese keinen IL-6R tragen [116].

Auch funktionelle, lösliche TLRs konnten in verschiedenen Systemen nachgewiesen werden. In der Mausmakrophagen-artigen Zelllinie RAW264.7 wurde eine alternative Spleißform der TLR4-mRNA identifiziert und kloniert [117]. Das resultierende 20 kDa Protein war in der Lage, die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung und TNF-Sekretion in Mausmakrophagen hemmen. Darüber hinaus konnte über eine LPS-Stimulation die Menge an alternativ gespleißter TLR4-mRNA erhöht werden, was auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus schließen lässt. Lösliches TLR2 konnte in humanem Plasma, Muttermilch [118] und Parotisspeichel [119] nachgewiesen werden. Die Sekretion von sTLR2 ließ sich durch die Stimulation von Monozyten steigern und rekombinantes sTLR2 hemmte den Stimulus von bakteriellen Lipopeptiden auf MM6-Zellen [118]. Die natürlich vorkommenden löslichen TLRs besitzen demnach eine negativregulierende Wirkung.

### **1.6.3.2 Lösliche TLR-Fusionsproteine**

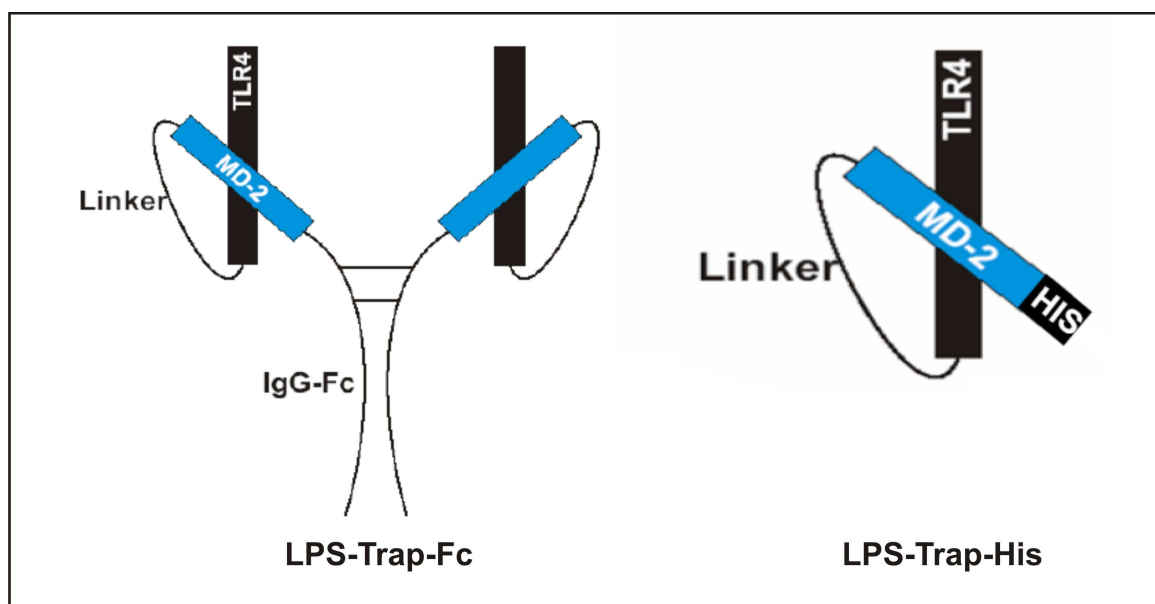
Das Ziel des Projekts „Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung der Toll-like Rezeptoren in der Sepsis“ bestand darin, mit löslichen TLRs die überschießende Immunantwort zu kontrollieren [120]. Da TLR2 in der Gram-positiven und TLR4 in Gram-negativen Sepsis herausragende Rollen in der Auslösung dieser Reaktion besitzen, lag der Fokus auf der Herstellung dieser löslichen Rezeptoren.

#### **1.6.3.2.1 Die LPS-Trap**

Untersuchungen mit löslichen murinen TLR4-Fc-Chimären (T4-Fc) zeigten keinen Einfluss auf die LPS-induzierte IL-6 Sekretion von RAW264.7-Zellen [120]. Erst durch Zugabe von rekombinantem MD-2 konnte ein Hemmeffekt erzielt werden. Da sMD-2 inaktive Oligomere bildet [121] und so nur schwerlich ein optimales stöchiometrisches Verhältnis zwischen sTLR4-Fc und seinem Akzessorprotein erreicht werden kann, wurden Fusionsproteine aus dem extrazellulären Teil von

Maus-TLR4 und Maus-MD-2 konstruiert [120]. Diese verfügen entweder über einen C-terminales His-Markerpeptid (LPS-Trap-His) oder ein humanes IgG-Fc-Fragment (LPS-Trap-Fc) (Abb. 1.11).

Die LPS-Trap-His bildete den TLR4/MD-2 Komplex, konnte LPS direkt binden und hemmte die LPS-induzierte TNF-Sekretion in RAW264.7 [120]. Weiterhin konnte in einem Pilotexperiment die LPS-hemmende Wirkung der LPS-Trap-His *in vivo* gezeigt werden [120]. Das Konzept der TLR4/MD-2-Fusionsproteine ist demnach ein viel versprechender Ansatzpunkt zur Kontrolle einer überschießenden Immunreaktion.



**Abb. 1.11: Die LPS-Trap-Fc und LPS-Trap-His**

Die Konstrukte bestehen aus dem Extrazellularteil von Maus-TLR4 verbunden über einen flexiblen Linker mit Maus-MD-2. Der C-Terminus der LPS-Trap-Fc besteht aus einem humanen IgG-Fc-Fragment, während die LPS-Trap-His ein 6xHis-Markerpeptid trägt  
Nach [120]

#### 1.6.3.2.2 Lösliche TLR2-Fc Fusionsproteine

Lösliche Maus-TLR2-Fc Fusionsproteine (T2-Fc) führten bei der Stimulierung von RAW264.7 sowohl mit LTA als auch mit dem triacylierten Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> zu einer dosisabhängigen Verstärkung der IL-6 Sekretion [120]. Dies wurde mit der Möglichkeit erklärt, dass T2-Fc mit TLRs auf der Zelloberfläche Aggregate bildete und so zu einer Verstärkung der Signaltransduktion führt.

## 1.7 Zielsetzung

Im Fokus dieser Dissertation steht das zweite, bisher nur oberflächlich untersuchte TLR4/MD-2 Fusionsprotein, die LPS-Trap-Fc. Mit dem Fernziel eine außer Kontrolle geratene Immunreaktion über diese Fusionsproteine modulieren zu können, soll zunächst ein optimales Expressionssystem gefunden und die Designerproteine *in vitro* biochemisch charakterisiert werden. Das gewonnene Protein kann anschließend auf seine biologische Aktivität gegen LPS und andere postulierte Liganden getestet werden. Da bisher noch nicht genau bekannt ist, welche Domänen der LPS-Trap für die LPS-Bindung essentiell sind, besteht ein weiteres Ziel in der Reduktion der LPS-Trap-Fc auf ihre pharmakologisch aktiven Bestandteile. Die Modifikation des flexiblen Linkers zwischen TLR4 und MD-2 stellt einen weiteren Ansatzpunkt für die Optimierung dar. Ferner könnte die LPS-Trap-Fc durch die Aggregation an Oberflächen über ihr humanes IgG-Fc Fragment Antikörper-ähnliche Eigenschaften entwickeln. Durch den Austausch des biologisch aktiven IgG1-Fragments mit inaktiven IgG2- oder IgG4-Fragmenten kann die potentielle Aktivität der Fc-Region bestimmt werden.

Nach einer erfolgreichen Testung der LPS-Trap-Fc *in vitro*, kann sie anschließend analog zu den vorausgegangenen Untersuchungen mit der LPS-Trap-His im Tiermodell auf ihre hemmende Aktivität gegen LPS und bei positiven Ergebnissen in Sepsis-Modellen untersucht werden.

Zudem soll die T2-Fc durch den Einbau einer TLR1- bzw. TLR6-Ektodomäne modifiziert werden. Die resultierenden TLR2/1-Fc und TLR2/6-Fc Fusionsproteine könnten anschließend *in vitro* auf ihre Hemmwirkung gegenüber di- und triacylierten Lipopeptiden getestet werden.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

|   |   |
|---|---|
| 1600R liquid scintillation analyzer                         | Canberra-Packard, Schwadorf, Österreich |
| Absorptionsspektrometer (für 96-well Platten, ELISA-Reader) | MWG Biotech, Denkendorf                 |
| Analysenwaage Sartorius analytic A120S                      | Sartorius, Göttingen                    |
| Autoklav  | Technomara, Fernwald                    |
| Brutschrank   | Heraeus, Hanau                          |
| Econo-Pumpe   | Bio-Rad, München                        |
| Econo-Säule   | Bio-Rad, München                        |
| Durchflusszytometer Coulter® EPICS® X - MCL™                | Beckman Coulter, Krefeld                |
| Durchlichtmikroskop   | E. Leitz, Wetzlar                       |
| Elektrophoreseapparaturen                                   | Biometra, Göttingen; Bio-Rad, München   |
| GENE PULSER® II   | Biorad, München                         |
| Kühl-Brutschrank  | Binder, Tuttlingen                      |
| Luminex® 100™   | Upstate, Charlottesville, VA, USA       |
| Megafuge 1.0R Zentrifuge                                    | Heraeus, Hanau                          |
| Mikroskop   | Olympus, Hamburg                        |
| Millipore Wasser-Filtrationsanlage                          | Millipore, Eschhorn                     |
| NanoDrop® 1000  | Peqlab, Erlangen                        |
| Neubauer-Zählkammer   | Brand, Wertheim                         |
| Optima™ L-70 Ultrazentrifuge (UZ)                           | Beckman-Coulter, Palo Alto, CA, USA     |
| pH-Meter  | Wiss. Tech. Werkst., Weilheim           |
| Laserimager Typhoon 8200                                    | Amersham, Braunschweig                  |
| Sterilbank  | Heraeus, Hanau                          |
| TE 77XP Semi-Dry Unit                                       | Hoefer, Holliston, MA, USA              |
| Thermocycler TRISTAR  | Biometra, Göttingen                     |
| Thermomixer   | Eppendorf, Hamburg                      |
| Tischzentrifuge E5415 C                                     | Eppendorf, Hamburg                      |
| Waage Sartorius excellence E1200S                           | Sartorius, Göttingen                    |
| X-Cell SureLock™mini-Cell                                   | Invitrogen, Karlsruhe                   |

### 2.2 Verbrauchsmaterial

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| ECL-Film                      | Amersham, Braunschweig; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA |
| Einmalpipetten                | Corning, Corning, NY, USA                                    |
| Elektroporationsküvetten 2 mm | Peqlab, Erlangen   |
| ELISA-Platten (MaxiSorp™)     | Nunc, Roskilde, Dänemark                                     |
| ELISA-Platten (Immunolon 2HB) | Thermo, Milford, MA, USA                                     |

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Kryoröhrchen  | Nunc, Roskilde, Dänemark             |
| Nitrocellulosemembran Optitran BA-S 83                        | Whatman, Dassel                      |
| PCR-Reaktionsgefäße   | Peqlab, Erlangen                     |
| Pierce Strong Anion Exchange Spin Columns                     | Thermo Scientific, Rockford, IL, USA |
| Petrischalen  | Falcon, Heidelberg                   |
| Polypropylenröhrchen für Durchflusszytometer                  | Sarstedt, Nümbrecht                  |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)                                | Eppendorf, Hamburg                   |
| Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)                               | Millipore, Eschborn                  |
| Szintillationsröhrchen  | Packard Instrument, Meriden, CT, USA |
| Transwells 24-well Millicell® Hanging Cell Culture Insert     | Millipore, Eschborn                  |
| Ultrafiltrationssäulen Vivaspin 20 (30.000 oder 100.000 MWCO) | Sartorius, Göttingen                 |
| Vakuum-Filtrationssystem (250 ml, 500 ml)                     | TPP, Trasadingen, Schweiz            |
| Whatman Filterpapier  | Biometra, Göttingen                  |
| Zellkulturflaschen  | Corning, Corning. NY, USA            |
| Zellkulturplatten (6- und 24-well)                            | Falcon, Heidelberg                   |
| Zellkulturplatten (96-well)                                   | Corning, Corning. NY, USA            |
| Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)                            | Falcon, Heidelberg                   |
| Zentrifugenröhrchen (für ZU, 13 x 51 mm)                      | Beckman, Palo Alto, CA, USA          |

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Nicht aufgeführte Feststoffe wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim), nicht aufgeführte Flüssigkeiten von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| 0,9% NaCl  | Braun, Melsungen                |
| Anti-Flag M2 Agarose Affinity Gel                            | Sigma-Aldrich, Steinheim        |
| Aqua ad iniectionem  | Braun, Melsungen                |
| Biotin-LPS   | Invivogen, Toulouse, Frankreich |
| BSA Fraktion V   | Biomol. Hamburg                 |
| <sup>14</sup> C-gekoppelte Fettsäuren (Öl- und Stearinsäure) | Sigma-Aldrich, Steinheim        |
| Chelatierende Sepharose                                      | Amersham, Uppsala, Schweden     |
| Escherichia coli BioParticles® (BODIPY FL-Konjugat)          | Invitrogen, Karlsruhe           |
| HMG-1  | Sigma-Aldrich, Steinheim        |
| HSA  | DRK, Baden-Baden                |
| Humanes Immunglobulin G                                      | Sigma-Aldrich, Steinheim        |
| Humanes Komplementserum                                      | Sigma-Aldrich, Steinheim        |
| LPS aus Escherichia coli 0111:B4                             | Sigma-Aldrich, Steinheim        |
| LPS aus Salmonella abortus equi S-Form                       | Alexis, Grünberg                |
| LTA aus Staphylococcus aureus                                | Sigma-Aldrich, Steinheim        |
| NBT/BCIP Tabletten   | Roche, Mannheim                 |
| Ni-NTA-Agarose   | Invitrogen, Karlsruhe           |
| Paclitaxel   | Sigma-Aldrich, Steinheim        |
| Pam <sub>2</sub> CSK <sub>4</sub>                            | Invivogen, Toulouse, Frankreich |

|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>                              | Invivogen, Toulouse, Frankreich |
| Protein G Sepharose  | Gerbu, Gaiberg                  |
| Reverse Transcription System                                   | Promega, Mannheim               |
| Trägerflüssigkeit Isoton <sup>®</sup> für Durchflusszytometrie | Coulter, Immunotech, Krefeld    |
| Transfektionsreagenz FuGENE <sup>®</sup> 6                     | Roche, Mannheim                 |
| Transfektionsreagenz FuGENE <sup>®</sup> HD                    | Roche, Mannheim                 |
| Transfektionsreagenz jetPEI <sup>™</sup>                       | Biomol, Hamburg                 |
| sCD14 (Maus)   | Alexis, Grünberg                |
| Streptavidin Sepharose   | Amersham, Uppsala, Schweden     |
| SYPRO <sup>®</sup> Red Protein Gel Stain                       | Invitrogen, Karlsruhe           |
| Szintillationscocktail   | Lumac, Groningen, Niederlande   |
| TMB  | Sigma-Aldrich, Steinheim        |
| Trypanblau   | Biochrom, Berlin                |

## 2.4 Enzyme und Kits

|   |  |
|---|--|
| Adeno-X <sup>™</sup> Virus Purification Kit               | Becton Dickinson, Heidelberg           |
| Beadlyte <sup>®</sup> Mouse Multi-Cytokine Flex Kit       | Biomol, Hamburg                        |
| CloneJET <sup>™</sup> PCR cloning kit                     | Fermentas, St. Leon-Rot                |
| Desoxynukleotidmischung                                   | Roche, Mannheim                        |
| ECL-Westernblot-Detektionskits                            | Amersham, Braunschweig                 |
| ELISA Human-IL-6  | Becton Dickinson, Heidelberg           |
| ELISA Maus-IL-6   | Becton Dickinson, Heidelberg           |
| ELISA Maus-TNF  | Biozol, Eching                         |
| Fast-Link <sup>™</sup> DNA Ligation Kit                   | Epicentre, Madison, WI, USA            |
| Gelextraktions Kits                                       | Hiss, Freiburg, Peqlab, Erlangen       |
| Glykosidasen  | NEB, Frankfurt am Main                 |
| Klenow-Fragment   | Fermentas, St. Leon-Rot                |
| Micro BCA <sup>™</sup> Protein Assay Kit                  | Pierce, Rockford, IL, USA              |
| PCR-Master-Mix Y  | Peqlab, Erlangen                       |
| PCR Aufreinigungs Kits                                    | Hiss, Freiburg; Peqlab, Erlangen       |
| Phusion <sup>™</sup> High-Fidelity DNA Polymerase         | Finnzymes, NEB, Frankfurt am Main      |
| Plasmid miniprep Kit                                      | Peqlab, Erlangen                       |
| QIAfilter Plasmid Maxi Kit                                | Qiagen, Hilden                         |
| QuantiPro <sup>™</sup> BCA Assay Kit                      | Sigma-Aldrich, Deisenhofen             |
| Restriktionsenzyme  | NEB, Frankfurt am Main; Roche Mannheim |
| RNeasy mini-Kit   | Qiagen, Hilden                         |
| Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)                         | Fermentas, St. Leon-Rot                |
| Zero Blunt <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> PCR Cloning Kit | Invitrogen, Karlsruhe                  |

## 2.5 Bakterien und Zelllinien

### 2.5.1 E. coli Stämme

|                 |                        |
|-----------------|------------------------|
| BL21(DE3) pLysS | Promega, Mannheim      |
| DH10bac         | Invitrogen, Karlsruhe  |
| DH5 alpha       | Invitrogen, Karlsruhe  |
| TOP10           | Invitrogen, Karlsruhe  |
| XL1-blue        | Stratagene, Heidelberg |

## 2.5.2 Sonstige Bakterienstämme

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Bacillus subtilis ATCC 6633     | Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg |
| Staphylococcus aureus ATCC 6538 | Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg |

## 2.5.3 Eukaryontische Zellen

|                   |  |
|-------------------|--|
| HEK293T           | Humane immortalisierte embryonale Nierenzellen               |
| Mono Mac 6        | Humane monozytische Leukämiezelllinie                        |
| QBI293A           | Subklon einer HEK293-Zelllinie; Q-BIOgene, Carlsbad, CA, USA |
| RAW264.7          | Murine monozytische, makrophagenähnliche Leukämiezelllinie   |
| Schneider S2      | Zelllinie aus Drosophila melanogaster Embryonen              |
| Sf-21             | Zelllinie aus dem Ovargewebe von Spodoptera frugiperda       |
| Tn-5 (High Five™) | Zelllinie aus dem Ovargewebe von Trichoplusia ni             |

## 2.6 Zellkulturmedien und -zusätze

### 2.6.1 Bakterienkultur

|  |                           |
|--|---------------------------|
| Ampicillin   | Ratiopharm, Ulm           |
| IPTG   | Biomol, Hamburg           |
| Gentamycin   | PAA, Pasching, Österreich |
| Kanamycin  | PAA, Pasching, Österreich |
| LB <sub>o</sub> (Lysogeny Broth) nach Miller       | Merck, Darmstadt          |
| LB <sub>o</sub> -Agar (Lysogeny Broth) nach Miller | Merck, Darmstadt          |
| SOC Medium   | Invitrogen, Karlsruhe     |
| Tetracyclin  | Sigma-Aldrich, Steinheim  |
| X-Gal  | Biomol, Hamburg           |
| Zeocin   | Invitrogen, Karlsruhe     |

## 2.6.2 Eukaryontische Zellkultur

|   |   |
|---|---|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)                     | PAN, Aidenbach; PAA, Pasching, Österreich |
| Dulbecco's PBS  | PAA, Pasching, Österreich                 |
| FCS   | PAN, Aidenbach                            |
| G418  | PAA, Pasching, Österreich                 |
| Gentamycin  | PAA, Pasching, Österreich                 |
| Glutamin  | PAA, Pasching, Österreich                 |
| Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) mit Calcium, Magnesium | Invitrogen, Karlsruhe                     |
| Hygromycin  | Invivogen, Toulouse, Frankreich           |
| Insect Xpress medium  | BioWhittaker, Lonza, Verviers, Belgien    |
| Natriumpyruvat  | PAA, Pasching, Österreich                 |
| nicht-essentielle Aminosäuren (NEAs)                        | PAA, Pasching, Österreich                 |
| OPI Media Supplement  | Sigma-Aldrich, Steinheim                  |
| OptiMEM   | Invitrogen, Karlsruhe                     |
| RPMI 1640 VLE   | Biochrom, Berlin                          |
| Trypsin/EDTA  | PAA, Pasching, Österreich                 |
| Zeocin  | Invitrogen, Karlsruhe                     |

## 2.7 Vektoren , Plasmide und Viren

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Ad-β-Gal                        | Innere Medizin I, Klinikum der Universität Regensburg |
| Ad-LPS-Trap-Fc                  | Bernd Schnabl, Regensburg                             |
| Flag T2Fc in pMT/BiP/V5-His C   | Katharina Brandl, Regensburg                          |
| LPS-Trap in p3xFlag-CMV-8       | Katharina Brandl, Regensburg                          |
| LPS-Trap-Fc in p3xFlag-CMV-8    | Katharina Brandl, Regensburg                          |
| LPS-Trap in pMT/BiP/V5-His C    | Katharina Brandl, Regensburg                          |
| LPS-Trap-Fc in pMT/BiP/V5-His C | Katharina Brandl, Regensburg                          |
| p3xFlag-CMV-8                   | Sigma-Aldrich, Deisenhofen                            |
| p3xFlag-CMV-9                   | Sigma-Aldrich, Deisenhofen                            |
| pCoHygro                        | Invitrogen, Karlsruhe                                 |
| pET-22b(+)                      | Novagen, Darmstadt                                    |
| pFastBac 1                      | Invitrogen, Karlsruhe                                 |
| pFUSE-hlgG3-Fc2                 | Invivogen, Toulouse, Frankreich                       |
| pFUSE-hlgG4-Fc2                 | Invivogen, Toulouse, Frankreich                       |
| pIRESneo3                       | Clontech, Mountain View, CA, USA                      |
| pMT/BiP/V5-His A                | Invitrogen, Karlsruhe                                 |

## 2.8 Oligonukleotidsequenzen

Die folgende Oligonukleotide wurden von den Firmen TIB MOLBIOL (Berlin) (2.8.1) und Operon (Köln) synthetisiert.



### 2.8.1 Kontrollprimer für cDNA

Mit den folgenden Primern wurde die Qualität von gewonnener cDNA überprüft.

|                 |                                       |
|-----------------|---------------------------------------|
| GAPDH for       | 5' TTA GCA CCC CTG GCC AAG G 3'       |
| GAPDH rev       | 5' CTT ACT CCT TGG AGG CCA TG 3'      |
| 5'β Actin for   | 5' GCT CAC CAT GGA TGA TGA TAT CGC 3' |
| 5'β Actin rev   | 5' GGA GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC 3' |
| 3'β Actin for   | 5' GAA GAT CAA GAT CAT TGC TCC TCC 3' |
| 3'β Actin rev   | 5' CTG GTC TCA AGT CAG TGT ACA GG 3'  |
| 6K Clathrin for | 5' GAC AGT GCC ATC ATG AAT CC 3'      |
| 6K Clathrin rev | 5' TTT GTG CTT CTG GAG GAA AGA A 3'   |
| 2K Clathrin for | 5' GCT CAC ATG GGA ATG TTC AC 3'      |
| 2K Clathrin rev | 5' ATG TTG TCA AAG TTG TCA TAA G 3'   |

### 2.8.2 Sequenzierprimer

Folgende Primer wurden für die Sequenzierung der konstruierten Plasmide verwendet.

|                    |   |
|--------------------|---|
| IgG1rev            | 5' CCC GCG GCT TTG TCT TGG CAT TA 3'    |
| IgG2cont.hingeleft | 5' GAC CGC AAA TGT TGT GTC GAG TGC 3'   |
| M13 (-20) forward  | 5' TTG TAA AAC GAC GGC CAG 3'           |
| M13 reverse        | 5' GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT 3'       |
| pJET1 Fwd          | 5' GCC TGA ACA CCA TAT CCA TCC 3'       |
| pJET1 Rev          | 5' GCA GCT GAG AAT ATT GTA GGA GAT C 3' |
| pMT forward        | 5' CAT CTC AGT GCA ACT AAA 3'           |
| pMT reverse        | 5' TAG AAG GCA CAG TCG AGG 3'           |
| T1.1s              | 5' CTG AGG GTC CTG ATA ATG TCC 3'       |
| T1.2s              | 5' GCC AAT ATG AAC ATC CAA AAC T 3'     |
| T2.1s              | 5' AGA TTT TGC TGG GCT 3'               |
| T2.2s              | 5' ACC TGA CCT CCC TTG ACA TC 3'        |
| T6.1s              | 5' CCA CAA CAG GAT ACG 3'               |
| T6.2s              | 5' TCG GTG TTT GCT GAG ATG AA 3'        |
| TLR4-s1            | 5' AAT TGA AGA CAA GGC ATG GCA T 3'     |
| TLR4-s2            | 5' ACC TGG CTG GTT TAC ACG TCC 3'       |
| TLR4-s3            | 5' AGG GTC ACA GAA TTC TCA GCG TT 3'    |
| TLR4-s4            | 5' TGG GTC AAG GAA CAG AAG CAG T 3'     |

### 2.8.3 Primer

|                     |   |
|---------------------|---|
| ASP-IgGFc-BamHI (1) | 5' ACT GGG ATC CTC ATT TAC CCG GAG A 3'                 |
| ASP-IgGFc-KpnI (2)  | 5' ACT GGG TAC CTC ATT TAC CCG GAG A 3'                 |
| ASP-IgGFc-XbaI (3)  | 5' ACT GTC TAG ATC ATT TAC CCG GAG A 3'                 |
| BamHIFlagbeginI (4) | 5' ACT GGG ATC CGG ACT ACA AAG ACG ATG ACG ACA AGC T 3' |

|                     |  |
|---------------------|--|
| BamHI3xFlagI (5)    | 5' ACT GGG ATC CGA CTA CAA AGA CGA TGA CGA CAA GC 3'                 |
| BamHIMD2r (6)       | 5' ACT GGG ATC CAT TGA CAT CAC GGC GGT GAA 3'                        |
| Flag-left-SpeI (7)  | 5' ACT GAC TAG TGA CTA CAA AGA CGA TGA CGA CAA GCT TG 3'             |
| FwdApaTrap-Fc (8)   | 5' GGG CCC CGA CTA CAA AGA CGA TGA CGA CAA GCT TG 3'                 |
| IgG2AgelCH3re. (9)  | 5' ACT GAC CGG TTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA GG 3'                 |
| IgG2Agelhinge+ (10) | 5' ACT GAC CGG TAA CGT AGA TCA CAA GCC CAG CAA CAC 3'                |
| RevTrapFcApaI (11)  | 5' GGG CCC TCA TTT ACC CGG AGA CAG 3'                                |
| SallIgGFcendr (12)  | 5' ACT GGT CGA CTC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA G 3'                  |
| SP-TLR1-XbaI (13)   | 5' ACT GTC TAG AAG TAT CAC AGG ATA GTG GAG 3'                        |
| SP-TLR2-BglII (14)  | 5' ACT GAG ATC TGC AGG AGT CTC TGT CA 3                              |
| SP-TLR2-KpnI (15)   | 5' ACT GGG TAC CAC AGG AGT CTC TGT CA 3                              |
| SP-TLR4-KpnI (16)   | 5' ACT GGG TAC CAC CAG GAA GCT TGA AT 3'                             |
| SP-TLR6-KpnI (17)   | 5' ACTGGGTACCAGTATCACAGGACAG 3'                                      |
| SP-Xa-Fc-KpnI (18)  | 5' ACT GGG TAC CAT CGA AGG TCG TGG T 3'                              |
| SP-Xa-Fc-XbaI (19)  | 5' ACT GTC TAG AAT CGA AGG TCG TGG T 3'                              |
| TLR-4KurzSpeI (20)  | 5' ACT GAC TAG TGG GTA GAT CCA GAG TTG GAA ACT GCT TAA GT 3'         |
| TLR-4MitteSpeI (21) | 5' ACT GAC TAG TGG CAC CAT TGA AGC TGA GGT CTA AGT 3'                |
| Tlr1Fselleft (22)   | 5' ACT GGG CCG GCC G GA GGA ATG TGA GCT TAT CAT AAA GAG GCC AAA C 3' |
| Tlr2BsiWlright (23) | 5' ACT GCG TAC GCT GGT GAC ATT CCA AGA CGG AGG G 3'                  |
| Tlr6Fselleft (24)   | 5' ACT GGG CCG GCC GAC CCC GTT CTC TAA TGA ACT TGA GTC TAT G 3'      |
| Tlr1ex_v1li (25)    | 5' TCC AAT TAT CTG AGG AAT GTG AGC TTA TCA 3'                        |
| Tlr1ex_v1re (26)    | 5' CCC GAT GGT GAC AGT CAG CAG AAC AGT 3'                            |
| Tlr6ex_v1li (27)    | 5' TCG GAA GCA R'TGA CCC CGT TCT CTA 3'                              |
| Tlr6ex_v1re (28)    | 5' CAG CAG AAC AGT ATC ACA GGA CAG TGG 3'                            |

## 2.8.4 Synthetische Oligonukleotide

|                       |   |
|-----------------------|---|
| AgelASlinker (1)      | 5' CCG GTC GAT CCG CCA CCG CCA GAG CCA CCT CCG CCT GAA CG CCT CCA CCA 3'        |
| AgelSlinker (2)       | 5' CCG GTG GTG GAG GCG GTT CAG GCG GAG GTG GCT CTG GCG GTG GCG GAT CAG 3'       |
| BsiWILinkerNewR (3)   | 5' CCC GAT CCG CCA CCG CCA GAG CCA CCT CCG CCT GAA CCG CCT CCA CCC 3'           |
| flexLi.BsiWIFsel (4)  | 5' GTA CGG GTG GAG GCG GTT CAG GCG GAG GTG GCT CTG GCG GTG GCG GAT CGG GCCGG 3' |
| Sfil-BIP-6xHis (5)    | 5' TGG CCT TTG TTG GCC TCT CGC TCG GGA GAT CTC ATC ATC ACC ATC ACC AT 3'        |
| Sfil-BIP-6xHis-rc (6) | 5' ATG GTG ATG GTG ATG ATG AGA TCT CCC GAG CGA GAG GCC AAC AAA GGC CAC GA 3'    |

|                 |  |
|-----------------|--|
| XhoASlinker (7) | 5' TCG AGC GAT CCG CCA CCG CCA GAG CCA CCT CCG<br>CCT GAA CG CCT CCA CCC 3'  |
| XhoSlinker (8)  | 5' TCG AGG GTG GAG GCG GTT CAG GCG GAG GTG GCT<br>CTG GCG GTG GCG GAT CGC 3' |

## 2.9 Größenstandards

Die Größen der Nukleinsäurefragmente in Agarosegelen wurden standardmäßig mit den Größenstandards GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus und GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) bestimmt.

Die Molekulargewichte der Proteine in SDS-Gelen bzw. im Western Blot wurden mit den Proteinleitern SeeBlue® Plus2 (Invitrogen, Karlsruhe) oder PageRuler™ Plus (Fermentas, St. Leon-Rot) definiert.

## 2.10 Antikörper und Kopplungsreagenzien

| Antikörper              | Konjugat | Spender     | Klon   | Hersteller                        |
|-------------------------|----------|-------------|--------|-----------------------------------|
| Anti-Flag               | ohne     | Maus-IgG1   | M2     | Sigma-Aldrich, Steinheim          |
| Anti-Flag               | FITC     | Maus-IgG1   | M2     | Sigma-Aldrich, Steinheim          |
| Anti-Flag               | HRP      | Maus-IgG1   | M2     | Sigma-Aldrich, Steinheim          |
| Anti-His                | HRP      | Maus-IgG2b  |        | Miltenyi, Bergisch Gladbach       |
| Anti-His                | ohne     | Maus-IgG1   |        | Qiagen, Hilden                    |
| Anti-human-HMG-1        | ohne     | Maus-IgG2b  | 115603 | R&D Systems, minneapolis, MN, USA |
| Anti-Maus-IgG           | HRP      | Ziege       |        | Sigma-Aldrich, Steinheim          |
| Anti-Maus-Immunglobulin | AP       | Kaninchen   |        | Dako, Glostrup, Dänemark          |
| Anti-human-IgG-Fc       | HRP      | Ziege       |        | Sigma-Aldrich, Steinheim          |
| Anti-Kaninchen-IgG      | HRP      | Ziege       |        | Sigma-Aldrich, Steinheim          |
| Anti-Maus-TLR4/MD-2     | ohne     | Ratte-IgG2a | MTS510 | Hycult, Uden, Niederlande         |
| Streptavidin            | HRP      |             |        | Hycult, Uden, Niederlande         |

## 2.11 Puffer und Lösungen

### 2.11.1 Lösungen und Zubehör für die Agarose-Gelelektrophorese

|                      |  |
|----------------------|--|
| DNA-Agarosegel       | 1-2% Agarose (w/v)<br>in TAE (1x)  |
| E-Gel® 1,2%, 2,0%    | Invitrogen, Karlsruhe  |
| Ethidiumbromidlösung | 0,04% Ethidiumbromid<br>in VE-Wasser   |
| TAE (50x)            | 2 M TRIS<br>250 mM Na-Acetat/Essigsäure pH 7,8<br>50 mM EDTA<br>in VE-Wasser   |
| Ladepuffer (10x)     | 200 mM TRIS/HCl pH 7,8<br>100 mM EDTA pH 8,0<br>1% SDS (w/v)<br>60% Glycerol (v/v)<br>0,1% Bromphenolblau<br>0,1% Xylencyanol<br>in aqua bidest. |

### 2.11.2 Lösungen und Zubehör für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

|   |   |
|---|---|
| Laemmli-Probenpuffer (6x)                     | 375 mM TRIS/HCl pH 6,8<br>12 mM EDTA<br>7,5% SDS (w/v)<br>60 % Glycerol (v/v)<br>0,2% Bromphenolblau (w/v)<br>in aqua bidest. |
| NuPAGE® 4-12% Bis-TRIS Gel 1mm x 12 well      | Invitrogen, Karlsruhe   |
| NuPAGE® 3-8% TRIS-Acetat Gel 1mm x 12 well    | Invitrogen, Karlsruhe   |
| NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)         | Invitrogen, Karlsruhe   |
| NuPAGE® TRIS-Acetat SDS Running Buffer (20x)  | Invitrogen, Karlsruhe   |
| TRIS-Glycin Laufpuffer (10x)                  | 250 mM TRIS<br>2,5 M Glycin<br>1% SDS (w/v)<br>in aqua bidest.  |
| ServaGel® TRIS-Glycin Gel 4-12% 1mm x 12 well | Serva, Heidelberg   |
| Western Blot Anodenpuffer A                   | 0,3 M TRIS pH 10,4<br>20 % Ethanol<br>in VE-Wasser  |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Western Blot Anodenpuffer B     | 25 mM TRIS pH 10,4<br>20% Methanol<br>in VE-Wasser                            |
| Western Blot Kathodenpuffer C   | 5,4 mM $\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure pH 7,6<br>20% Methanol<br>in VE-Wasser |
| Western Blot Blockierlösung     | 5% Magermilchpulver (w/v)<br>in Western Blot Waschlösung                      |
| Western Blot Waschlösung (PBST) | 0,05% Tween 20 (v/v)<br>in PBS  |

### 2.11.3 Sonstige Puffer und Lösungen

|  |  |
|--|--|
| Adenovirus-Lagerungs-Puffer                                  | 10 mM TRIS pH 8,0<br>2 mM $MgCl_2$<br>5% Sucrose   |
| Agarose-Elutionspuffer für Szintillationsmessung             | 2% SDS (w/v)<br>5 mM EDTA<br>in PBS  |
| Caesiumchlorid-Lösung $\rho = 1,2 \text{ kg/m}^3$ (CsCl 1,2) | 26,8 g CsCl<br>92 ml 10 mM TRIS pH 7,9   |
| Caesiumchlorid-Lösung $\rho = 1,4 \text{ kg/m}^3$ (CsCl 1,4) | 53 g CsCl<br>87 ml 10 mM TRIS pH 7,9   |
| ELISA Beschichtungspuffer                                    | 50 mM $NaHCO_3$ pH 9,6<br>in aqua bidest.  |
| ELISA Blockierlösung   | 5% BSA<br>In Waschpuffer   |
| ELISA Waschpuffer  | 0,05% Tween 20<br>in PBS   |
| ELISA Stopplösung  | 1 M $H_2SO_4$  |
| Elutionspuffer Chelatierende Sepharose                       | 10mM – 500mM Imidazol<br>in 50 mM TRIS/HCl pH 8,0  |
| Elutionspuffer Protein G Chromatographie                     | 0,1 M Glycin/HCl pH 2,8 – 4,0  |
| PBS  | 137 mM NaCl<br>2,68 mM KCl<br>10 mM $NaH_2PO_4$<br>1,76 mM $K_2HPO_4$<br>in aqua bidest. |
| TBS (10x)  | 1,5 M NaCl<br>100 mM TRIS<br>in aqua bidest<br>pH 7,6 mit HCl einstellen                 |

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde nach Anleitung des RNeasy mini Kits durchgeführt.

Die Zellen (RAW 264.7,  $< 5 \times 10^6$ ) wurden zunächst in einem  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigen Lysepuffer aufgenommen und durch das mehrmalige Auf- und Abziehen über eine 20 Gauge Kanüle geschert und auf diese Weise lysiert. Das Lysat wurde mit Ethanol verdünnt und durch eine Säule mit einer Silicagel-Membran zentrifugiert. Diese Membran fixierte die RNA und diese konnte nach mehreren Waschschritten mit RNase-freiem Wasser eluiert werden. Die Menge und Reinheit der isolierten RNA wurde anschließend mit dem NanoDrop<sup>®</sup> 1000 bestimmt.

#### 3.1.2 Gewinnung von cDNA durch Reverse Transkriptase-PCR

Über eine Reverse Transkriptase konnte die in der isolierten Gesamt-RNA enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Die RT-PCR wurde sowohl mit Oligo(dT)<sub>15</sub> als auch mit zufällig generierten (Random) Primern durchgeführt. Für die Umschreibung wurde das *Reverse Transcription System* genutzt.

| Ansatz                          |          | Programm                                     |                                    |
|---------------------------------|----------|--|------------------------------------|
| RNA                             | 1 µg     | 22°C (bei Random Pr.)<br>42°C<br>95°C<br>4°C | 10 min<br>15 min<br>5 min<br>5 min |
| MgCl <sub>2</sub>               | 4 µl     |  |                                    |
| dNTPs, je 10mM                  | 2 µl     |  |                                    |
| Puffer (10x)                    | 2 µl     |  |                                    |
| RNase Inhibitor                 | 0,5 µl   |  |                                    |
| Reverse Transkriptase           | 15 u     |  |                                    |
| Oligo(dT) <sub>15</sub> /Random | 1 µl     |  |                                    |
| Primer (500 ng/µl)              |          |  |                                    |
| H <sub>2</sub> O                | ad 20 µl |  |                                    |

Die Integrität der gewonnenen cDNA wurde anschließend mit den Primern aus 2.8.1 auf die jeweiligen Haushaltsgene untersucht.

### 3.1.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

#### 3.1.3.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die DNA-Sequenzen können durch den Einsatz bakterieller Polymerasen in einer PCR amplifiziert werden [122]. Durch die Nutzung zweier entgegengesetzt orientierter Primer können Fragmente spezifisch vermehrt und optional um gewünschte Restriktionsenzymsschnittstellen erweitert werden. Polymerasen mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität führen zu einer geringeren Fehlerrate bei der Amplifikation (*proof-reading*), verringern aber gleichzeitig die Geschwindigkeit. Die in dieser Arbeit verwendete *Phusion High Fidelity Polymerase* erreicht durch die Fusion mit einem weiteren *Pyrococcus*-Enzym eine höhere Genauigkeit und Geschwindigkeit als herkömmliche *Proof-Reader*. Grundsätzlich wurden Ansätze folgendermaßen durchgeführt:

| Ansatz              |           | Programm    |          |
|---------------------|-----------|-------------|----------|
| Templat DNA         | 1 ng-5 ng | 98°C        | 30 s     |
| dNTPs, je 10mM      | 1 µl      | 98°C        | 10 s     |
| Puffer (5x)         | 10 µl     | 54°C - 64°C | 20 s     |
| S Primer 10µM       | 2 µl      | 72°C        | 20 s/1kb |
| AS Primer 10µM      | 2 µl      | 72°C        | 5-10 min |
| Polymerase (2 u/µl) | 0,5 µl    | 4°C         | ∞        |
| H <sub>2</sub> O    | ad 50 µl  |             |          |

Anschließend wurden die PCR-Fragmente auf einem Agarosegel analysiert und aus dem PCR-Ansatz mit Hilfe der PCR Aufreinigungs Kits nach Anleitung der Hersteller gereinigt.

#### 3.1.3.2 Restriktionsverdau

Für das Schneiden von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurden die Enzym- und Pufferkombinationen der Firmen New England Biolabs bzw. Roche verwendet. Grundsätzlich wurden Ansätze in folgendermaßen durchgeführt:

| Ansatz           |                | Programm                            |
|------------------|----------------|-------------------------------------|
| DNA              | 0,1 µg – 10 µg | 37°C bzw. 50°C, 55°C      1 h – 3 h |
| Puffer (10x)     | 2 µl           |                                     |
| Enzym(e)         | 0,5 u -1u      |                                     |
| H <sub>2</sub> O | ad 20 µl       |                                     |

Die verwendeten Puffer und Temperaturen wurden aus den Tabellen der jeweiligen Hersteller der Restriktionsenzyme (NEB, Roche) entnommen.

### 3.1.3.3 Gelelektrophorese

PCR- oder Restriktionsverdau-Produkte konnten über Gelelektrophorese analysiert werden. Hierfür wurde Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (1% - 2% w/v) in TAE-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit Ethidiumbromidlösung (2 µl pro 100 ml Gel) versetzt und in vorbereitete Formen gegossen. Nach der Festigung des Gels wurden die mit dem Ladepuffer versetzten DNA-Proben bei 100V in Gelelektrophoresekammern aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TAE. Für analytische Zwecke wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Schirm bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und photographiert.

### 3.1.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um die Schädigung der DNA bei einer präparativen Gelelektrophorese zu verhindern, wurden die gewünschten DNA-Fragmente bei einer Wellenlänge von 366 nm sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel wurde nach der Anleitung der Hersteller durchgeführt (siehe 2.4)

### 3.1.3.5 Enzymatische Manipulation der DNA

#### 3.1.3.5.1 Dephosphorylierung mit SAP

Um eine Religation von geschnittenen Plasmiden über kompatible überhängende oder glatte Enden zu verhindern, wurden die 5'-Termini der DNA mit SAP dephosphoryliert. Hierfür wurde der Restriktionsverdauansatz zunächst nach



folgendem Schema zusammen mit SAP verdaut und anschließend die Phosphatase deaktiviert.

| Ansatz             |          | Programm |        |
|--------------------|----------|----------|--------|
| Restriktionsverdau | 20 µl    | 37°C     | 30 min |
| Puffer (10x)       | 2 µl     | 65°C     | 15 min |
| H <sub>2</sub> O   | ad 49 µl | 4°C      | ∞      |
| SAP                | 1 µl     |          |        |

Anschließend wurden die dephosphorylierten Plasmide über PCR-Aufreinigungs-Kits aus dem Ansatz isoliert

### 3.1.3.5.2 Behandlung mit Klenow-Fragment

Für die Umwandlung von überhängenden in glatte Enden wurde das Klenow-Fragment verwendet. Dieses Enzym stellt ein Fragment der DNA-Polymerase I dar und besitzt eine 5'-3'-Polymerase- und 3'-5'-Exonukleaseaktivität. So konnten 5'-Überhänge unter Zugabe von dNTPs aufgefüllt werden, während ohne Zugabe von dNTPs 3'-Überhänge abgebaut wurden. Folgende Ansätze wurden für die Generierung von glatten Enden verwendet:

| Ansatz           |               | Programm |        |
|------------------|---------------|----------|--------|
| Verdaute DNA     | 0,1 µg – 4 µg |          |        |
| Puffer (10x)     | 2 µl          | 37°C     | 5 min  |
| dNTPs (10mM)     | 0,5 µl        | 75°C     | 10 min |
| Klenow-Fragment  | 1 u -5 u      |          |        |
| H <sub>2</sub> O | ad 20 µl      |          |        |

Anschließend wurden die Ansätze mit PCR Reinigungs-Kits gereinigt.

### 3.1.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die modifizierten und isolierten DNA-Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen in entsprechend geschnittene und dephosphorylierte Plasmide mit Hilfe des Fast-Link™ DNA Ligation Kits kloniert. Durch die Analyse der zu ligierenden DNA-Fragmente im Agarosegel wurde die ungefähre Menge an DNA

abgeschätzt und ein molares Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA von 2:1 eingesetzt.

| Ansatz           |               | Programm |            |
|------------------|---------------|----------|------------|
| Puffer (10x)     | 0,1 µg – 4 µg |          |            |
| ATP (10 mM)      | 2 µl          |          |            |
| Vektor DNA       | x             | 22°C     | 5 - 15 min |
| Insert DNA       | x             | 70°C     | 15 min     |
| H <sub>2</sub> O | ad 14 µl      |          |            |
| DNA Ligase       | 1 µl          |          |            |

### 3.1.4 Vermehrung und Gewinnung von Plasmidvektoren

#### 3.1.4.1 Transformation und Kultivierung von *E. coli*

Für die Transformation von elektrokompenten Bakterien (XL1-Blue, DH5alpha, DH10bac) wurden 2 µl des Ligationsansatzes direkt mit 50 µl Bakteriensuspension auf Eis vermischt. Die Transformation erfolgte in gekühlten Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 2 mm) mit Hilfe eines Elektroporators unter folgenden Bedingungen:

|            |              |
|------------|--------------|
| Spannung   | 2,5 kV       |
| Widerstand | 200 Ω        |
| Kapazität  | 25 µF        |
| Dauer      | 4,7 – 5,2 ms |

Chemischkompetente Bakterien (TOP10) wurden mit dem kompletten Ligationsansatz gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Daraufhin wurden die Bakterien für 45 Sekunden bei 42°C im Thermoblock erhitzt und anschließend sofort für 2 min auf Eis gestellt.

Nach der Transformation wurden die Bakterien mit 250 µl SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend erfolgte die Ausplattierung auf mit entsprechenden Antibiotika versetzten LB-Agar-Platten und die Kultivierung bei 37°C über Nacht. Positive Bakterienklone wurden mit Hilfe spezifischer Primer für das Plasmid über eine PCR nach folgendem Ansatz ermittelt:

| Ansatz            |       | Programm |        |
|-------------------|-------|----------|--------|
| Bakterienklon     | q.s.  | 98°C     | 10 min |
| PCR-Master-Mix    | 10 µl | 98°C     | 30 s   |
| S-Primer (10 µM)  | 1 µl  | 55°C     | 30 s   |
| AS-Primer (10 µM) | 1 µl  | 72°C     | 30 s   |
| H <sub>2</sub> O  | 8 µl  | 72°C     | 5 min  |
|                   |       | 4°C      | ∞      |

### 3.1.4.2 Mini-/ Maxipräparation von Plasmiden

Für die Vermehrung von Plasmiden wurden transformierte Bakterien über Nacht in 3 ml (Minipräparation) bzw. 250 ml (Maxipräparation) LB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Selektionsantibiotika bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation mit 6000xg pelletiert und die Plasmid-DNA über die Mini- bzw. Maxipräparations-Kits isoliert.

Das Prinzip dieser Kits beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, Entfernung von genomischer DNA und Proteine durch Zentrifugation und der Fixierung der Plasmid-DNA in einer Membran. Nach dem Waschen der Membran konnte die Plasmid-DNA eluiert und über eine Isopropanol/Ethanol-Fällung nochmals gereinigt werden. Die präzipitierte DNA wurde in TRIS/EDTA-Puffer gelöst und bei – 20°C gelagert.

### 3.1.4.3 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von klonierten Plasmiden wurde bei der Firma Geneart in Regensburg durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen konnten mit Hilfe der *Vector NTI 10* Software (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zusammengesetzt und mit den entsprechenden Mustersequenzen verglichen werden.

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Kulturbedingungen

HEK293T und QBI293A-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS bei 37°C, 5% (DMEM, PAN) bzw. 10% (DMEM, PAA) Kohlendioxidgehalt und 95% relativer

Luftfeuchte kultiviert. Bei serumfreier Haltung wurde das Medium Panserin ohne weitere Zusätze bei sonst identischen Bedingungen (5% CO<sub>2</sub>) verwendet. Zur Selektionierung von pIRESneo3-transfizierten Zellen wurde 1,0 mg/ml G418 zugesetzt.

Die Kultivierung monozytischer Zelllinien (MM6, RAW 264.7) erfolgte mit VLE RPMI ergänzt mit 10% endotoxinarmen FCS bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Den MM6-Zellen wurde *OPI Media Supplement*, den RAW264.7  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt.

Schneider S2-Zellen wurden bei 21°C ohne zusätzliche CO<sub>2</sub>-Begasung in Insect Xpress-Medium plus 10% FCS kultiviert. Die Selektion fand unter Anwesenheit von 300  $\mu$ g/ml Hygromycin statt. Sollten produzierte Fusionsproteine über Affinitätschromatographie gereinigt werden, wurde kein FCS zugesetzt.

Die für die Baculovirus-Produktion genutzten Sf-21- und High Five™-Zellen wurden bei 28°C ohne CO<sub>2</sub> in Insect Xpress-Medium ohne weitere Zusätze kultiviert.

Als Einfriermedium wurde das entsprechende Kulturmedium unter Zusatz von 20% FCS und 10% DMSO verwendet.

### 3.2.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl und die Vitalität der kultivierten Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Hierfür wurden 20  $\mu$ l Zellsuspension entnommen und diese mit dem gleichen Volumen an 0,05% Trypanblaulösung versetzt. Die Anzahl der ungefärbten lebenden und blau gefärbten toten Zellen konnte anschließend über die Auszählung einer oder mehrerer Großquadrate im Phasenkontrastmikroskop nach folgender Formel bestimmt werden:

$$n \text{ (Zellen/ml)} = (Z / Q) \times V \times 10^4$$

Z = Zahl der Zellen im Großquadrat

Q = Anzahl der ausgezählten Großquadrate

V = Verdünnungsfaktor

### 3.2.3 Transfektionen

Die Transfektion von Zellen wurde nach dem Prinzip der Lipofektion durchgeführt. Hierbei werden die zu transfizierenden Plasmide von Liposomen umschlossen. Die Liposomen-DNA-Komplexe fusionieren anschließend mit der Zellmembran und die Plasmide gelangen in den Zellkern.

Die Transfektionsreagenzien jetPEI™ und FuGene® 6 wurden für die Transfektion von Plasmiden in Säuger- und Insektenzellen, FuGene® HD für die Transfektion der Baculoviren-Bacmid-DNA in Sf-21-Zellen nach Anleitung der Hersteller verwendet. Üblicherweise erfolgte die Transfektion von Zellen bei einer Konfluenz von 50% (Säugerzellen) oder 80% (Insektenzellen). Die Verhältnisse von Transfektionsreagenz (µl) zu DNA (µg) betrugen 2:1 (jetPEI), 3:1-2 (FuGENE 6) oder 4-6:2 (FuGENE HD). Die Bildung der Komplexe erfolgte in OptiMEM (Säugerzellen) oder aqua ad injectabilia (Insektenzellen) für 20 min bei RT. Die Komplexe wurden anschließend gleichmäßig über die adhärennten Zellen verteilt und die Zellen für 8 bis 16 h in serumfreien, Gentamycin-haltigen Medium kultiviert. Danach wurde das Medium gewechselt, FCS und nach Bedarf Selektionsantibiotika (siehe 3.2.1) zugesetzt.

### **3.2.4 Transwell-Assay**

Zur Überprüfung der biologischen Aktivität der Fusionsproteine in ihrer nativen Form wurde ein Transwell-Assay etabliert.  $2 \times 10^5$  HEK293T wurden 8 h nach ihrer Transfektion mit der entsprechenden Fusionsprotein-DNA-Sequenz in p3xFlag-CMV-8 in 24-well Platten ausgesät und Transwells mit  $2,5 \times 10^4$  MM6 bzw. RAW264.7 eingesetzt. Die Zellen wurden 48 h in dem Medium der jeweiligen monozytischen Zelllinie (1,25 ml 24-well, 200 µl Transwell) kultiviert. Die Stimulation mit den angegebenen Reagenzien erfolgte bei einer Messung von TNF für 4 h und bei der Messung von IL-6 über Nacht.

### **3.2.5 Zellkultur adenoviral infizierter QBI293A**

Die verwendeten humanen Adenoviren Typ 5 sind durch Genomdeletionen ( $\Delta E1$  und  $\Delta E3$ ) in konventionellen Säugerzellen nicht vermehrungsfähig. Für die Amplifikation wird deshalb die Zelllinie HEK293 genutzt, welche ein Transformationsprodukt aus embryonalen Nierenzellen mit gescherter Adenovirus 5-DNA darstellen [123]. Durch die Fragmente der Adenovirus 5-DNA werden die fehlenden Genomsequenzen teilweise komplementiert und das Virus kann sich vermehren. Die in dieser Arbeit verwendeten QBI293A sind ein auf höhere Adhärenz selektionierter Subklon der HEK293-Zelllinie. Die Arbeiten mit adenoviralen Vektoren wurden ausschließlich in Labors der Sicherheitsstufe S2 unter einer Laminar-Flow-Einheit durchgeführt.

### 3.2.5.1 Vermehrung von Adenoviren

Die adenoviralen Stocks (Ad-LPS-Trap-Fc) wurden freundlicherweise von Bernd Schnabl, Regensburg, zur Verfügung gestellt. Für den Einsatz im Tiermodell musste dieser Stock auf ca.  $10^{11}$  PFU/ml amplifiziert werden. Hierfür wurden  $5 \times 10^6$  QBI293A-Zellen in einer  $75 \text{ cm}^2$  Zellkulturflasche ausgesät und mit  $25 \times 10^6$  Ad-LPS-Trap-Fc-Partikeln (MOI 5) infiziert. Um eine optimale Infektion der Zellen durch hohe Virenkonzentration zu erreichen, betrug das Volumen des Inokulums lediglich 1 ml. Nach 90 min bei  $37^\circ\text{C}$  wurde das Mediumvolumen durch DMEM plus 5% FCS auf 10 ml ergänzt. Die Vermehrung der Adenoviren äußerte sich durch eine Abrundung der Zellen, worauf ihre Lösung aus dem Zellverband und Lyse folgte (Cytopathischer Effekt, CPE). Nach 72 h wurden die Zellen zusammen mit dem Überstand drei Frier-Tauzyklen ( $N_2$  fl -  $37^\circ\text{C}$ ) unterzogen und Zellreste durch Zentrifugation entfernt. Mit 3 ml dieses Zelllysats wurden anschließend  $3 \times 10^7$  QBI293A infiziert (MOI ~25) und nach 72 h wiederum die Zelllysate gewonnen. Im dritten Vermehrungszyklus wurden analog  $3 \times 10^8$  Zellen mit 35 ml Zelllysate aus Zyklus 2 infiziert. Hier erfolgte die Ernte der Zellen bereits vor ihrer Lyse nach 48 h. Die Zellen wurden pelletiert, vereinigt, in 10 ml DMEM plus 5% FCS aufgenommen und durch drei Frier-Tauzyklen lysiert.

### 3.2.5.2 Isolierung von Adenoviren

Die Isolierung der Adenoviren erfolgte über einen Caesiumchlorid-Gradienten. Das Zelllysate aus Vermehrungsschritt 3 wurde zunächst durch Zentrifugation von Zellresten befreit. In einem Zentrifugenröhrchen (13 x 51 mm) wurden 4 ml CsCl 1,4 mit 3 ml CsCl 1,2 und 4,5 ml Zelllysate überschichtet. Die infektiösen Viruspartikel konnten über den Gradienten nach 18-stündiger Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge bei  $100.000 \times g$  von den restlichen Bestandteilen getrennt werden. Die weiß-bläulich schimmernde Bande aus infektiösen Virenpartikeln wurde mit einer Spritze über eine 23 Gauge Kanüle abgesaugt. Anschließend wurde das CsCl durch Dialyse gegen Adenovirus-Lagerungs-Puffer entfernt und die Partikel bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.5.3 Bestimmung des adenoviralen Titers

Der adenovirale Titer wurde über die *Tissue Culture Infectious Dose 50* (TCID<sub>50</sub>) Methode bestimmt. Als biologische Nachweismethode basiert sie auf der Entwicklung des CPE in QBI293A-Zellen durch eine vorangegangene Vireninfektion.

10<sup>4</sup> QBI293A pro Vertiefung in 100 µl DMEM plus 2% FCS wurden in 96-well Platten ausgesät. Von den jeweiligen Virenstocks wurden Verdünnungsreihen bis 10<sup>-12</sup> in DMEM plus 2% FCS erstellt. 100 µl der acht höchsten Verdünnungen wurden jeweils in die senkrechten Reihen 1-10 der 96-well Platte gefüllt. Die Reihen 11 und 12 wurden mit virusfreiem DMEM plus 2% FCS aufgefüllt und dienten als Negativkontrolle. Nach 10-tägiger Kultivierung bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurden die CPE-positiven Vertiefungen im Mikroskop gezählt und der Titer nach folgender Formel berechnet:

$$T \text{ (TCID}_{50}\text{/ml)} = 10^{1+1 \times (S-0,5)} \times 10$$

Validierungen der Firma Quantum Biotechnologies ergaben, dass die nach TCID<sub>50</sub>-Methode bestimmten Titer um 0,7xlog höher sind als im Standard Plaque Assay.

$$T \text{ (PFU/ml)} = 10^{1+1 \times (S-1,2)} \times 10$$

S = Summe der CPE-positiven Vertiefungen der Verdünnungsschritte ab 10<sup>-1</sup> /10

Die adenoviralen Titer wurden jeweils in zwei voneinander unabhängigen Titrations ermittelt.

### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

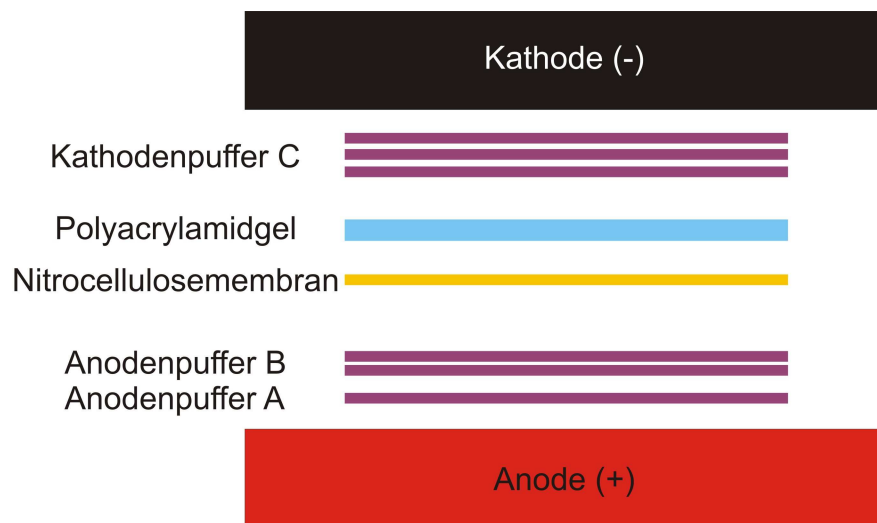
#### 3.3.1 Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis, SDS-PAGE) dient zur analytischen Trennung von Proteinen über ein Polyacryamid-Gel. Die Proteine werden zunächst durch die Behandlung mit Probenpuffer denaturiert. Das darin enthaltene SDS überdeckt die Eigenladung, was eine Auftrennung ausschließlich nach der Größe der zu untersuchenden Proteine ermöglicht. Durch die Zugabe von DTT kann zusätzlich die Reduktion von Disulfidbrücken erreicht werden.

Die Proben wurden standardmäßig bei 92°C 5 min in 2x Laemmli-Puffer gekocht. Für die elektrophoretische Auftrennung wurden je nach Größe des zu analysierenden Proteins verschiedene Gradientengele und Puffersysteme benutzt (siehe 2.11.2).

### 3.3.2 Western Blotting

Für die Übertragung der in der SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde das *Semi-dry*-Verfahren nach [124] benutzt. Hierfür wurden je ein Filterpapier (Whatman) in Anodenpuffer A, zwei in Anodenpuffer B und drei in Kathodenpuffer C getränkt. Das Gel und die Nitrocellulosemembran wurden ebenfalls in Kathodenpuffer C equilibriert und die Blotapparatur nach Abb. 3.1 aufgebaut. Die Übertragung der Proteine in die Membran erfolgte mit dem TE 77XP Semi-dry Blotter für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 1,5 mA pro cm<sup>2</sup> Gel.



**Abb. 3.1:** Schematischer Aufbau der Blotapparatur im Semi-dry-Verfahren

### 3.3.3 Nachweis von Proteinen

#### 3.3.3.1 Direkte Färbung von Proteinen in Gelen

Für die direkte Detektion von Proteinen nach ihrer Auftrennung im Polyacrylamidgel wurde der Farbstoff SYPRO<sup>®</sup> Red benutzt. Das Gel wurde hierfür 30 min in einer Färbelösung (SYPRO<sup>®</sup> Red 1:10000 in 7,5% Essigsäure) unter Lichtausschluss geschwenkt. Die Proteine wurden in einem Schritt fixiert und angefärbt. Anschließend wurde das Gel kurz mit 7,5% Essigsäure gespült, um überschüssige Färbelösung zu entfernen. Die Proteine konnten im *Typhoon laser imager* bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm und dem Emissionsfilter 610 BP 30 visualisiert werden.



### 3.3.3.2 Immunofärbung von Proteinblots

Nach dem elektrophoretischen Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde diese für 1 h bei RT, oder bei 4°C über Nacht mit Blockierlösung inkubiert. Nach dem Abnehmen der Lösung wurde der in Blockierlösung verdünnte Primär-Antikörper (1µg/ml) auf die Membran gegeben und 1 h bei RT geschwenkt. War der primäre Antikörper nicht HRP oder AP gekoppelt, wurde die Membran dreimal 5 min mit Waschlösung gewaschen und zusätzlich mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten von je 15 min konnte der Blot abhängig vom gekoppelten Enzym gefärbt werden. Für Peroxidase-gekoppelte Antikörper wurde ein ECL-Färbeprotokoll (ECL plus Detection Kit) verwendet. Hier katalysierte die HRP die Oxidation von Luminol. Die entstehende Lumineszenz wurde auf einem Röntgenfilm mit unterschiedlicher Expositionsdauer je nach Signalintensität aufgenommen. Der Film konnte anschließend in einem Entwicklerautomaten entwickelt werden.

Wurde ein AP-gekoppelter Antikörper eingesetzt, konnte das geblottete Protein über BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphat) und NBT (Nitroblau Tetrazoliumchlorid) direkt auf der Nitrocellulosemembran visualisiert werden.

### 3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit bestimmt. Dieser basiert auf der BCA-Methode zur photometrischen Messung von Proteinkonzentrationen. In wässriger alkalischer Lösung wird  $\text{Cu}^{2+}$  durch Protein zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert. Dieses bildet mit zwei Molekülen BCA einen farbigen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

Für die Bestimmung wurden 25 µl proteinhaltige Lösung mit 200 µl  $\text{BCA/Cu}^{2+}$  (50:1) in einer 96-well Platte vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Standard wurde BSA in einem Konzentrationsbereich von 2000 µg/ml – 25 µg/ml verwendet. Die entstandenen Farbkomplexe konnten im Absorptionsspektrometer bei einer Wellenlänge von 540 nm vermessen und die Proteinkonzentration über eine Eichgerade bestimmt werden.

### 3.3.5 Isolierung der LPS-Trap aus Zellüberständen

#### 3.3.5.1 Protein G Affinitätschromatographie

Für die Reinigung von Fusionsproteinen mit einem hlgG-Fc-Teil wurde Protein G Sepharose verwendet. Bei der Isolierung über eine Econo-Säule wurde diese mit 2 ml einer 50% Suspension von Protein G Sepharose beladen und mit 20 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 bis 800 ml Zellkulturüberstand mit Hilfe einer Pumpe bei 4°C mehrmals über die Säule geschleust. Die Säule wurde mit 50 ml PBS gewaschen und die Fusionsproteine mit 1 ml 0,1 M Glycin/HCl-Puffer (pH 2,8 oder 4,0) in 4 Fraktionen eluiert. Die Eluate wurden sofort mit 20 µl 1,5 M TRIS pH 8,8 neutralisiert und anschließend gegen PBS dialysiert.

Bei einer Reinigung durch Immunpräzipitation wurde der Zellüberstand auf 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und mit 200 µl der 50% Protein G Suspension pro 50 ml 2 h im Rotator inkubiert. Zur Vermeidung von Blasenbildung wurden die Röhrchen vollständig mit PBS aufgefüllt. Die Sepharose wurde anschließend bei 850xg pelletiert, in 5 ml PBS resuspendiert und in eine Säule geladen. In der Säule erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 10 ml PBS. Die weiteren Schritte deckten sich mit der Isolierung über die Econo-Säule.

#### 3.3.5.2 Affinitätschromatographie über Metallchelate-bindende Säulen

Fusionsproteine mit einem 6xHis Epitop (LPS-Trap-His, His-LPS-Trap-Fc) wurden über Metallchelatchromatographie gereinigt. Da dem Medium von S2-Zellen für die Induktion des Methallothionin-Promotors  $\text{CuSO}_4$  zugesetzt wurde, wurde eine modifizierte Metallochelate-Affinitätschromatographie verwendet [125]. Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen bilden bevorzugt Komplexe mit dem Imidazolrest der Aminosäure Histidin. Diese Komplexe wiederum binden mit höherer Affinität an die Iminodiessigsäuremoleküle der chelatierenden Sepharose als freie Kupferionen. Die Isolierung wurde wie in 3.3.5.1 entweder über eine Säule oder als Präzipitation durchgeführt. Die Elution erfolgte in drei Schritten mit je 1 ml 10 mM, 50 mM und 500 mM Imidazol in 10 mM TRIS pH 8,0. Die Fraktionen wurden ebenfalls gegen PBS dialysiert.

### 3.3.5.3 Isolierung über Ionenaustauschersäule

Die His-LPS-Trap-Fc wurde alternativ zu den bereits genannten Methoden auch über Anionenaustauschersäulen gereinigt. Der isoelektrische Punkt der His-LPS-Trap-Fc befindet sich bei pH 6,04. Folglich lag das Protein in neutralen oder leicht basischen Lösungen als Anion vor und konnte so über eine mit quartären Ammonium-Ionen beladene Anionenaustauschersäule (*Pierce Strong Anion Exchange Spin Columns*) isoliert werden. Dafür wurden 10 ml His-LPS-Trap-Fc-haltiger Überstand mit 100 µl 1,5 M TRIS pH 8,8 alkalisiert und zusätzlich mit 10 ml Wasser verdünnt, um die Ionenkonzentration zu vermindern. Eine Anionenaustauschersäule wurde mit 5 ml 25 mM TRIS pH 8,8 equilibriert und der behandelte Überstand zweimal durch die Säule zentrifugiert. Das Protein konnte anschließend mit 2 ml 1,5 M TRIS pH 8,8 (2 Wiederholungen) aus der Säule eluiert werden. Das Eluat wurde sofort gegen PBS dialysiert.

### 3.3.6 Größenausschlusschromatographie

Für die Konzentrierung von Zellüberständen wurden Ultrafiltrationssäulen mit einem Größenausschluss von 30.000 MWCO (LPS-Trap-His) oder 100.000 MWCO (LPS-Trap-Fc) verwendet. Es wurde jeweils 20 ml Überstand transfizierter QBI293A-Zellen durch Zentrifugation auf 2 ml eingengt. Dies entsprach demnach einer Konzentrierung um den Faktor 10. Die Konzentrate wurden anschließend gegen PBS dialysiert.

## 3.4 Immunologische Methoden

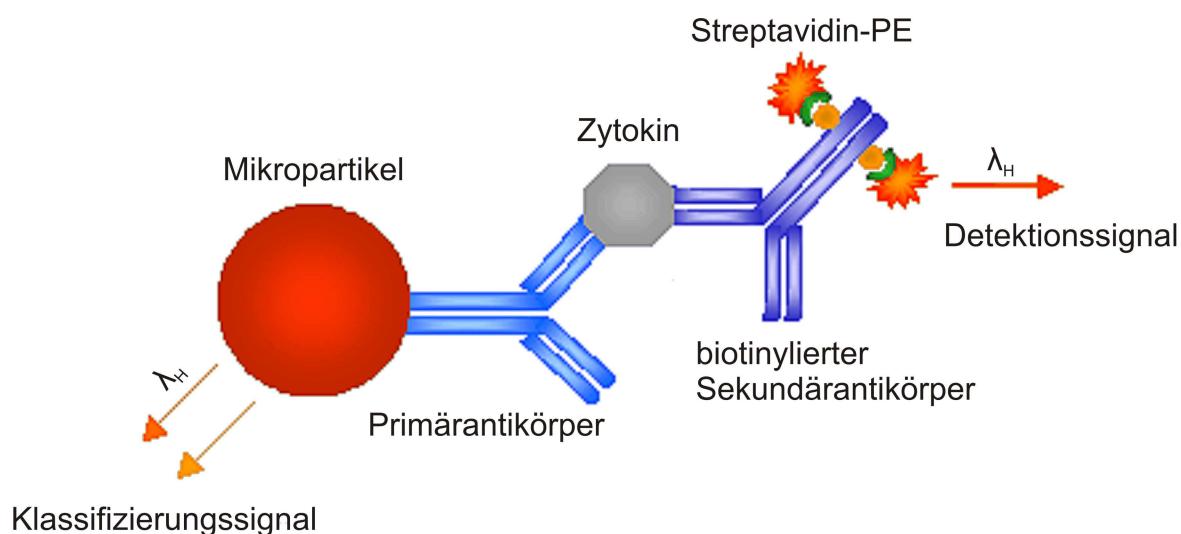
### 3.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Quantifizierung von Zytokinen in Zellüberständen erfolgte mit Zytokin-ELISAs. Hierfür wurden MaxiSorp™ 96-well ELISA-Platten mit einem Fang-Antikörper (2-10 µg/ml in ELISA Beschichtungspuffer) über Nacht bei 4°C beschichtet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde die Platte mit PBST plus 5% BSA 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurden die verdünnten Proben (100 µl) in Duplikaten 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde 50 µl einer Mischung aus biotinyliertem Detektionsantikörper (1 µg/ml) und Streptavidin-HRP zugegeben und eine weitere Stunde bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die Platte fünfmal mit PBST gewaschen und 100  $\mu$ l TMB-Substrat-Lösung pro Vertiefung zugegeben. Nach 30 min wurde die Reaktion mit 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt und die entstanden Farbkomplexe im Absorptionsspektrometer bei den Wellenlängen 450 nm minus 540 nm vermessen. Sämtliche Auswertungen wurden mit der Software *SOFTmax for Windows 2.35* durchgeführt.

### 3.4.2 Multi-Zytokinbestimmungen im Luminex® 100

Zytokin-Bestimmungen von Serumproben aus Tierexperimenten wurden mit dem Luminex® 100-System durchgeführt. Dieses System basiert auf dem Prinzip eines ELISAs mit dem Unterschied, dass die Zytokine nicht an eine Mikrotiterplatte sondern über einen Antikörper an fluoreszierende Mikropartikel gebunden werden. Über verschiedenfarbige Mikropartikel und einem Klassifizierung-Laser (635 nm) ist es somit möglich, mehrere Zytokine parallel zu vermessen. Die Quantifizierung erfolgt über einen biotinylierten Sekundärantikörper, der über Streptavidin-PE und einem Detektionslaser (532 nm) (Abb. 3.2) detektiert werden kann.



**Abb. 3.2: Zytokindetektion im Luminex® 100**

Alle nachfolgenden Reagenzien stammten aus einem *Beadlyte® Mouse Multi-Cytokine Flex Kit*, der für die Quantifizierung der Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12(p70), MCP-1 und TNF kombiniert wurde. Alle Inkubationsschritte wurden im Dunkeln bei RT durchgeführt.

Für die Untersuchungen wurden Mikrotiter-Filterplatten mit Assay.Puffer (*Cytokine Assay Buffer*) equilibriert und die Vertiefungen mit 50  $\mu$ l Zytokinstandard

oder 10 µl Serum plus 15 µl *Cytokine Assay Buffer* und 25 µl *Serum Diluent* befüllt. Nach 20-minütiger Inkubation auf einem Schüttler wurde je 25 µl Primärantikörper-Mikropartikel (*Beadlyte<sup>®</sup> Anti-Mouse Cytokine Beads*) hinzugefügt und die Platte 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgesaugt, während die Mikropartikel durch den Filter zurückgehalten wurden. Die Partikel wurden einmal mit Assay-Puffer gewaschen und mit 75 µl Assay-Puffer resuspendiert. Es folgte eine 1,5-stündige Inkubation mit 25 µl Sekundärantikörperlösung (*Beadlyte<sup>®</sup> Anti Mouse Cytokine, Biotin*) und eine anschließende 30-minütige Inkubation mit 25 µl Streptavidin-PE-Lösung. Nach Zugabe einer Stopp-Lösung (*Beadlyte<sup>®</sup> Stop Solution*) wurde die gesamte Flüssigkeit abgesaugt und die Mikropartikel in 125 µl Assay-Puffer resuspendiert. Die Messung der Zytokine wurde mit einem *Luminex<sup>®</sup> 100 Analyzer* durchgeführt, das Protokoll und die Auswertung mit der Software *Luminex<sup>®</sup> 100 IS*.

### 3.4.3 LPS-Trap-Bindungsassays

#### 3.4.3.1 LPS Pull-down Assay

Für den Nachweis der Bindung von LPS an die Fusionsproteine wurde 1,8 ml Zellüberstand mit 200 µl FCS versetzt und mit 0,5 µg/ml biotinyliertem LPS 1 h bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die LPS-Fusionsprotein-Komplexe für 30 min mit 20 µl Streptavidin Sepharose gefällt. Die Präzipitate wurden dreimal mit PBST gewaschen, in 40 µl 2x Laemmli resuspendiert und 5 min bei 92°C aufgekocht. Nach der Pelletierung der Sepharose konnten die Überstände über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Anti-Flag Western Blot detektiert werden.

Bei der Überprüfung von gereinigten Fusionsproteinen wurde der Assay in PBS plus 20% FCS durchgeführt. In einigen Versuchen wurde noch zusätzlich mit rekombinantem Maus-CD14 (0,5 µg/ml) inkubiert.

Sollte die Konformation der LPS-Trap überprüft werden, wurden die Überstände 1 h mit 10 µg/ml TLR4/MD-2 Antikörper vorinkubiert. Sollte die kompetitive Hemmung der LPS-Bindung getestet werden, wurden die Testsubstanzen in einem 100-fachen (unmarkiertes LPS) oder 1000-fachen (Fettsäuren) molaren Überschuss zugegeben und parallel mit Biotin-LPS inkubiert.

### 3.4.3.2 Bindungs-Assay mit $^{14}\text{C}$ -Fettsäuren

Zur Überprüfung der Bindung von Fettsäuren an TLR4/MD-2 wurde die LPS-Trap-His mit 20  $\mu\text{l}$  Anti-Flag M2 Agarose aus 2 ml S2-Überstand pro Ansatz über Nacht bei 4°C immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde mit 1 oder 10  $\mu\text{M}$  Albumin-gekoppelter,  $^{14}\text{C}$ -markierter Fettsäure (Öl- und Stearinsäure) in TBS plus 20% FCS 2 h bei RT inkubiert. Zusätzlich wurden einige Proben noch mit einem 100-fachen molaren Überschuss an unmarkierter Fettsäure versetzt. Das Agarose-Gel wurde dreimal mit TBS gewaschen und anschließend in Agarose-Elutionspuffer resuspendiert, um die vollständige Ablösung der gebundenen Substanzen von der Agarose zu gewährleisten. Die Gelsuspension wurde mit je 10 ml Szintillations-Cocktail vermischt und die Radioaktivität im Szintillationsmessgerät gemessen. Kontrollüberstände mit Flag-sAcP wurden analog präpariert.

Die spezifische Bindung in Prozent wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{(\text{cpm gebundene } ^{14}\text{C} - \text{cpm gebundene } ^{14}\text{C} \text{ mit Überschuss an unmarkierter Fettsäure})}{\text{total eingesetzte cpm}}$$

### 3.4.3.3 LPS-Bindungs-ELISA

Für die relative Quantifizierung der LPS-Bindung der Fusionsproteine wurde ein LPS-Bindungs-ELISA etabliert. Die Inkubationen erfolgten bei RT und zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde jeweils dreimal mit PBST gewaschen. Zunächst wurden MaxiSorp™ 96-well ELISA-Platten über Nacht mit Anti-Flag M2 mAb (1  $\mu\text{g/ml}$ ) beschichtet. Nach einer 1-stündigen Blockierung mit PBS plus 5% BSA wurden die Platten mit den Fusionsprotein-haltigen Lösungen 2 h inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit 100  $\mu\text{l}$  Biotin-LPS in PBS plus 20% FCS pro Vertiefung für 1 h. Anschließend konnte das gebundene LPS mit Streptavidin-HRP (0,25  $\mu\text{g/ml}$ , 30 min) detektiert werden. Nach der Zugabe der TMB-Substrat-Lösung (100  $\mu\text{l/Vertiefung}$ ) wurde nach 30 min die Farbreaktion mit 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt und die Farbkomplexe im Absorptionsspektrometer bei 450 nm minus 540 nm vermessen.

### 3.4.3.4 Fusionsprotein-Bindungs-ELISAs

Um die Menge an Fusionsprotein in Zellüberständen bestimmen zu können, wurde der LPS-Bindungs-ELISA (siehe 3.4.3.3) modifiziert. Die Platten wurden nach ihrer Anti-Flag-Beschichtung für 2 h mit titrierten Überständen inkubiert. Daraufhin

erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Anti-hlgG-Fc mAb (1:5000) in PBS plus BSA 1%. Die Detektion verlief identisch zum LPS-Bindungs-ELISA (siehe 3.4.3.3).

Zur Überprüfung der Bindung an Paclitaxel wurden Immunolon 2HB ELISA-Platten über Nacht bei RT mit 10  $\mu$ M Paclitaxel bzw. 10  $\mu$ g/ml LPS in ELISA-Beschichtungspuffer beschichtet. Die Platten wurden einmal mit PBST gewaschen und mit PBS plus 5% BSA und 5% Sucrose für 1 h blockiert. Anschließend wurde mit 100  $\mu$ l LPS-Trap-Fc- oder T2/6-Fc-haltigen (Kontrolle) Überständen 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBST wurde 1 h HRP-gekoppelter Anti-hlgG-Fc mAb inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion analog zum LPS-Bindungs-ELISA (siehe 3.4.3.3).

Der Bindungsassay von T2/1-Fc und T2/6-Fc an LTA erfolgte identisch zu obiger Arbeitsanweisung. Die Platten wurden mit 10  $\mu$ g/ml LTA beschichtet.

#### 3.4.3.5 Bakterien-Bindungs-Assays

Zur Untersuchung der Bindung von LPS-Trap an bakterielle Oberflächen wurden 1 ml Fusionsprotein-haltige Überstände oder gereinigte LPS-Trap-His in PBS mit 10 % FCS versetzt und mit hitzeinaktivierten  $5 \times 10^7$  *E. coli* K12 oder Kontrollbakterien (*B. subtilis*, *S. aureus*) 1 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert und zweimal mit PBS plus 10% FCS (PBS 10%) gewaschen. Anschließend wurden die Pellets mit PBS 10% resuspendiert und 1 h mit einem FITC gekoppelten Anti-Flag M2 mAb (1  $\mu$ g/ml) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS 10% konnte gebundene LPS-Trap im Durchflusszytometer detektiert werden.

Ein weiterer LPS-Bindungsassay basierte auf einem ELISA. Hierfür wurden 100  $\mu$ l lebende Bakterien in PBS ( $5 \times 10^8$  CFU/ml) pro Vertiefung auf eine Immunolon 2HB ELISA-Platte beschichtet. Nach dem 1-stündigen Blockieren mit PBS plus 5% BSA wurden die Bakterien mit LPS-Trap-His oder -Fc-haltigen Zellüberständen 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal mit PBST gewaschen und die gebundenen Fusionsproteine mit einem HRP-gekoppelten Anti-Flag mAb (1  $\mu$ g/ml, 1 h) detektiert. Nach drei Waschschriffen mit PBST erfolgte die weitere Detektion analog zu 3.4.3.3.



### 3.4.4 Phagozytoseassay

Für die Überprüfung der Opsonisierungseigenschaften der LPS-Trap-Fcs1-4 wurde ein Phagozytoseassay etabliert.  $5 \times 10^6$  BODIPY-markierte *E. coli* Partikel wurden mit 2 ml Fusionprotein-haltigen, serumfreien QBI293A-Überständen bzw. 10 oder 100  $\mu\text{g/ml}$  humanem IgG als Kontrolle 1 h bei RT inkubiert (Opsonisierungsphase). Anschließend wurden die Partikel dreimal mit PBS gewaschen. Die Phagozytose wurde bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $5 \times 10^5$  MM6-Zellen in HBSS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -haltig) plus 0,5% HSA über die angegebenen Zeitspannen durchgeführt. Um besseren Kontakt zwischen Phagozyten und *E. coli*-Partikeln zu schaffen, wurden diese vor der Phagozytose bei 500xg 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die Phagozytose wurde durch die Zugabe von 0,02%  $\text{NaN}_3$  und Kühlung auf Eis gestoppt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit PBS gewaschen und mit 0,05% Trypanblau versetzt, um die Fluoreszenz anheftender, nicht phagozytierter Partikel zu quenchen. Die Intensität der Phagozytose wurde im Durchflusszytometer bestimmt.

### 3.4.5 Komplementaktivierungsassay

Die Komplementaktivierung wurde indirekt über die Lyse von *E. coli* Bakterien bestimmt. Mit einem GFP-Expressionsvektor transformierte *E. coli* wurden in einer Übernachtskultur expandiert. Die Bakterien wurden nach ihrer Pelletierung in PBS auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 ( $\sim 5 \times 10^8$  CFU/ml) resuspendiert.  $5 \times 10^6$  Bakterien wurden zu 10-fach konzentrierten, gegen PBS dialysierten, LPS-Trap-His oder -Fc-haltigen Überständen gegeben und 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Komplementreaktion mit 1  $\mu\text{l/ml}$  humanem Komplementserum in HBSS plus 0,5% HSA für 90 min bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Reaktion wurde durch die Kühlung auf Eis gestoppt. Anschließend konnte die Prozentzahl an noch lebendigen Bakterien im Durchflusszytometer bestimmt werden.

### 3.4.6 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden auf einem Coulter® EPICS® XL-MCL™ durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm EXPO™ 32 ADC Software (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten FITC, BODIPY und GFP. Für die Messung wurden folgende drei Parameter herangezogen:



1. Forward Scatter (FS): Zellform und –größe
2. Sideward Scatter (SS): Zellgranularität
3. Fluoreszenzkanal 1 (FL 1): Emittierte Fluoreszenz im Wellenlängenbereich von 535 nm (grün)

Die Parameter wurden für die Auswertung logarithmisch aufgetragen.

Pro Ansatz wurden 15.000 bis 25.000 Zellen vermessen. Für die Überprüfung der LPS-Trap-Bindung an bakterielle Oberflächen (siehe 3.4.3.5) konnten die Bakterien aufgrund ihrer Größe im FS identifiziert werden. Gebundene LPS-Trap wurde über einen FITC-gekoppelten Anti-Flag-M2 mAb im Fluoreszenzkanal 1 quantifiziert.

Die MM6-Zellen im Phagozytoseassay konnten aufgrund ihrer FS- und SS-Charakteristika bestimmt werden. Die Phagozytoserate konnte über fluoreszente MM6 im FL 1 bestimmt werden.

Die GFP-exprimierenden Bakterien wurden durch ihre Größe im FS und Fluoreszenz im FL 1 identifiziert. Nicht mehr fluoreszente Bakterien wurden als tot betrachtet. In Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass bereits nach 30 min die Fluoreszenz abgetöteter Bakterien erlischt.

## 3.5 Tierexperimente

### 3.5.1 Adenovirale Infektion

Um die LPS-Trap-Fc *in vivo* zu produzieren, wurden weibliche CD-1 Mäuse (Gewicht 18-20 g) mit  $10^9$  PFU/ml Ad-LPS-Trap-Fc oder Ad- $\beta$ -Gal als Kontrolle infiziert. Die Viren wurden hierfür in 0,9% NaCl verdünnt und nach der Anästhesierung der Mäuse in das Venengeflecht hinter dem Augapfel gespritzt (retrobulbär).

### 3.5.2 Gewinnung von Serum aus Vollblut

Die Blutabnahme erfolgte retrobulbär nach Anästhesierung der Mäuse. Das gewonnene Vollblut wurde zum Gerinnen 16 h bei 4°C gelagert. Der Blutpfropf wurde vorsichtig von Reaktionsgefäßwand abgelöst und bei 500xg abzentrifugiert. Das Serum wurde anschließend sofort verarbeitet oder bei -20°C tiefgefroren.

### 3.5.3 Überprüfung der LPS-Trap-Fc(Ad)-Serumspiegel

Die Anwesenheit von LPS-Trap-Fc(Ad) im Serum wurde über eine Immunpräzipitation überprüft. 10 µl Serum wurde auf 1000 µl mit TBS verdünnt und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit 20 µl Anti-Flag-Agarose immunpräzipitiert. Die Agarose wurde dreimal mit TBS gewaschen und anschließend in 40 µl 2x Laemmli-Puffer 5 min bei 92°C gekocht, um die Proteine aus dem Gel abzulösen. Der Präzipitat-Überstand wurde anschließend über ein SDS-Gel aufgetrennt und die LPS-Trap-Fc(Ad) im Anti-Flag Western Blot detektiert.

Um eine quantitative Aussage über die LPS-Trap-Fc(Ad)-Serumspiegel zu gewinnen, wurde ein LPS-Trap-Fc-Bindungs-ELISA (siehe 3.4.3.4) mit Mausserum anstelle von Zellüberständen durchgeführt. Pro Vertiefung wurde 10 µl Serum mit 90 µl PBS verdünnt. Die Messung erfolgte in Duplikaten.

### 3.5.4 LPS Stimulation von Mäusen

Um die *in vivo*-Aktivität der LPS-Trap-Fc(Ad) zu testen, wurden je 6 Ad-LPS-Trap-Fc- und Ad-β-Gal-infizierte CD-1 Mäuse am Tag 4 p.i. 1 µg hochreines LPS in 0,9% NaCl i.v. (retrobulbär) injiziert. Nach 60 min wurden die Mäuse geblutet und das Serum gewonnen (siehe 3.5.2). Die TNF und MCP-1-Spiegel im Serum wurden mittels Luminex gemessen (siehe 3.4.2).

## 3.6 Statistik

Für die statistische Analyse der Transwell-Assays und Tierexperimente wurden jeweils 8 bzw. 6 Proben über den Mann-Whitney-U-Test verglichen. Für den Komplementaktivierungsassay wurden die Ergebnisse von 6 Experimenten herangezogen. Bei Mehrfachvergleichen erfolgte die Analyse der Varianzen durch einfaktorielle ANOVA bzw. bei einem parameterfreien statistischen Test durch den Kruskal-Wallis-Test. Der Tukey-Test diente der Post-hoc-Analyse. Als signifikanter Unterschied wurden Ergebnisse mit  $p < 0,05$  betrachtet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Box-Whisker-Plots unter Darstellung des Medians, der Ausreißer und der 10.-, 25.-, 75.- und 90.-Perzentilen.

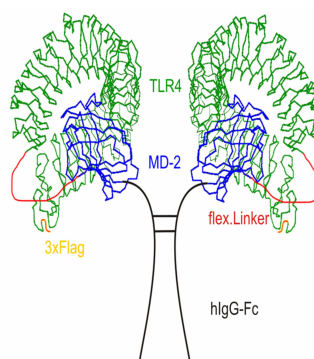
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Modulation der TLR4-Signaltransduktion durch die LPS-Trap-Fc

TLR4 spielt eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr gegen die Gram-negative bakterielle Sepsis. Bei einer plötzlichen Überschwemmung mit Bakterien gerät dieser Schutzmechanismus außer Kontrolle und wendet sich gegen den eigenen Organismus. Es konnte gezeigt werden, dass lösliche TLR4/MD-2 Fusionsproteine (LPS-Trap-His) das Potential besitzen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine LPS-induzierte proinflammatorische Reaktion zu hemmen [120]. In den folgenden Studien wurden die Eigenschaften von hIgG-Fc-Chimären des Fusionsproteins (LPS-Trap-Fc) untersucht.

#### 4.1.1 Produktion der LPS-Trap-Fc in verschiedenen Zellsystemen

Durch die Kopplung der LPS-Trap an ein humanes IgG-Fc-Fragment erhoffte man sich in erster Linie eine problemlose Reinigung aus Zellüberständen und aufgrund der verlängerten Bluthalbwertszeit eine erhöhte Effektivität im Sepsis-Tiermodell (Abb. 4.1). Zunächst wurden verschiedene Expressionssysteme für die LPS-Trap-Fc untersucht, um ausreichende Proteinmengen für *in vivo* Versuche zu gewinnen.



**Abb. 4.1: LPS-Trap-Fc**

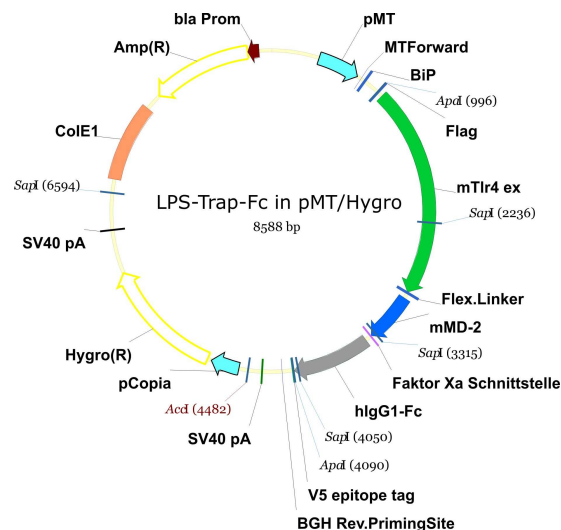
Die extrazelluläre Domäne von Maus-TLR4 wurde über einen flexiblen Linker bestehend aus 15 Aminosäuren an Maus-MD-2 gekoppelt. Die Dimerisierung des Fusionsproteins erfolgte über ein humanes IgG-Fc-Fragment. Als Marker diente ein N-terminales Flag-Peptid.

#### 4.1.1.1 Schneider S2-Zellen

Die Expression in der *Drosophila*-Zelllinie Schneider S2 stellt eine effektive und logistisch unkomplizierte Form der Proteingewinnung dar. Die Vorteile liegen in der anspruchslosen Kultivierung, die ohne zusätzliche Befeuchtung und CO<sub>2</sub>-Begasung bei Temperaturen zwischen 21 und 28°C erfolgt. Darüber hinaus wird spontan eine überdurchschnittlich hohe Anzahl von Genkopien in eine einzelne S2-Zelle eingebaut, was zu hohen Ausbeuten in der Proteinproduktion führen kann.

##### 4.1.1.1.1 Klonierung der LPS-Trap-Fc in pMT/Hygro

Im *Drosophila*-Expressionssystem wird der Expressionsvektor gemeinsam mit einem Co-Vektor, der das Resistenzgen für die Selektion trägt, transfiziert. Um die Zahl resistenter, aber nicht produzierender Zellen möglichst gering zu halten, wird üblicherweise mit einem Massenverhältnis von Expressions- zu Co-Vektor von 20 zu 1 transfiziert. Diese Unwägbarkeit sollte durch das Einfügen des Hygromycin-Resistenzgens in den Expressionsvektor beseitigt werden. Hierfür wurde die Hygromycin-Kassette aus pCO-Hygro mit den Restriktionsenzymen *SapI* und *AccI* herausgeschnitten und über die entsprechenden Schnittstellen in den Expressionsvektor pMT/BiP/V5-His A ligiert (Abb. 4.2).



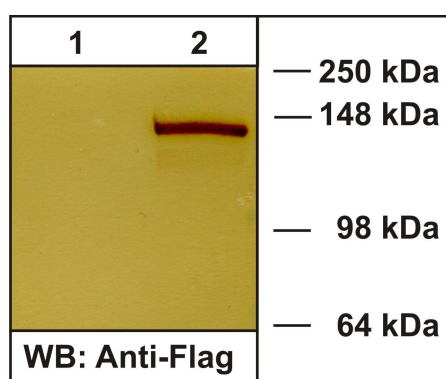
**Abb. 4.2: LPS-Trap-Fc in kombiniertem Selektions/Expressionsvektor pMT/BiP/V5-HisA/Hygro (pMT/Hygro)**

Die Hygromycin-Resistenzgen-Kassette wurde in den Expressionsvektor pMT/BiP/V5-HisA kloniert. Mit dem kombinierten Vektor ist ohne weitere Transfektion eines Selektionsvektors die Selektion von stabilen Transfektanten möglich. Die LPS-Trap-Fc DNA-Sequenz wurde in das Leseraster der BiP-Signalsequenz eingefügt

Dieser neue Vektor vereinigte das zu exprimierende Gen mit dem Resistenzgen auf einem Vektor. Die Funktion der Resistenz-Kassette wurde durch die erlangte Antibiotikaresistenz von S2-Zellen überprüft (Daten nicht gezeigt). Der pMT/Hygro verfügt über einen insektenspezifischen Metallothioneinpromotor, der eine induzierbare Expression erlaubt, und eine BiP-Signalsequenz, wodurch das gewünschte Protein in den Zellüberstand sezerniert wird. Die Sequenz der LPS-Trap-Fc wurde mit den Primern (8) und (11) aus dem Expressionsvektor LPS-Trap-Fc in pMT/BiP/V5-His C durch eine PCR amplifiziert und N- und C-terminal *ApaI* Restriktionsschnittstellen eingefügt. Nach der Zwischenklonierung in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO, wurde die Sequenz mit *ApaI* ausgeschnitten und in den entsprechend verdauten und dephosphorylierten Vektor pMT/Hygro eingefügt (Abb. 4.2).

#### 4.1.1.1.2 Expression der LPS-Trap-Fc

Für einen Expressionstest der LPS-Trap-Fc wurden S2-Zellen transient entweder mit pMT/Hygro alleine als Negativkontrolle oder mit pMT/Hygro/LPS-Trap-Fc transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Proteinproduktion mit Kupfersulfat induziert. Nach weiteren 48 h wurden je 10 µl Zellüberstand über eine SDS-Page aufgetrennt. Im Anti-Flag-Western-Blot zeigte sich die Bande des Fusionsproteins bei ca. 130 kDa (Abb. 4.3), während in der Spur der kontrolltransfizierten Überstände erwartungsgemäß keine Bande sichtbar war.

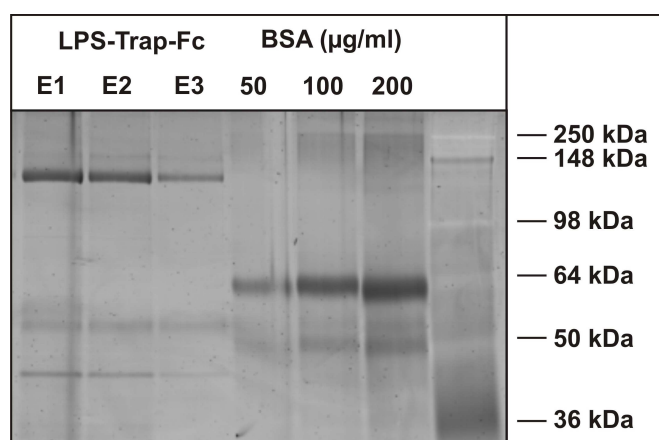


**Abb. 4.3: Expression der LPS-Trap-Fc in S2-Zellen**

Überstände von Kontroll- (Spur 1) und pMT/Hygro/LPS-Trap-Fc transfizierten S2-Zellen (Spur 2) wurden 48 h nach Induktion der Proteinproduktion mittels SDS-Page analysiert. Das Fusionsprotein mit einer Masse von ca. 130 kDa konnte im Anti-Flag Western Blot nachgewiesen werden.

#### 4.1.1.1.3 Reinigung der LPS-Trap-Fc

Für die Großproduktion von LPS-Trap-Fc sollten zunächst stabile Transfektanten gewonnen werden. Hierfür wurden S2-Zellen mit pMT/Hygro/LPS-Trap-Fc transfiziert und 24 h später das Selektionsantibiotikum Hygromycin zugegeben. Nach einer vierwöchigen Selektion wurden die Zellen eine Woche lang mit Kupfersulfat stimuliert und anschließend das Kulturmedium mit Protein G immunpräzipitiert. Die Elution aus der Säule erfolgte mit einem Glycin/HCl Puffer pH 2,8. Die einzelnen Proteinfractionen wurden in einem SDS-Gel analysiert. Nach der Sypro Red Färbung zeigte die LPS-Trap-Fc Bande bei 130 kDa (vgl. 4.1.1.1.2). Es traten nur sehr schwache Banden anderer Proteine auf, die Reinheit der Eluate war vergleichsweise hoch. Die Konzentrationen der einzelnen Fraktionen bewegten sich zwischen 50 und 200 µg/ml. Die daraus hochgerechnete Gesamtmasse an produziertem Protein von ca. 175 µg war für S2-Zellen sehr gering. Dies entspricht einer Konzentration von lediglich 1,75 µg/ml Protein im Überstand transfizierter Zellen.



**Abb. 4.4: Gereinigte LPS-Trap-Fc nach Immunpräzipitation über Protein G Sepharose**

Überstände von LPS-Trap-Fc transfizierten S2-Zellen wurden über eine Protein G Säule gereinigt. Die einzelnen Elutionsfraktionen (E1-E3) wurden in einer reduzierenden SDS-Page aufgetrennt und analysiert. BSA in unterschiedlichen Konzentrationen wurde als Mengenstandard verwendet. Die Färbung des Gels erfolgte mit SYPRO Red Protein Gel Stain.

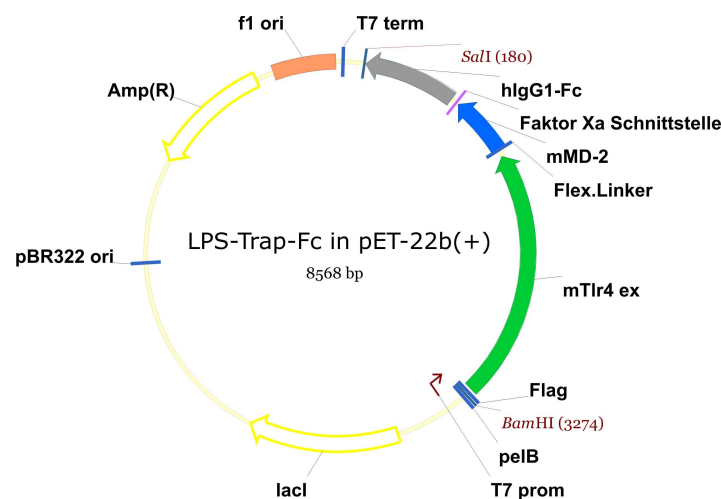
#### 4.1.1.2 Escherichia coli

Die Proteinproduktion in speziellen *E. coli* Stämmen kann eine effektive Alternative zu Zellsystemen sein. Die Kultivierung und Vermehrung der Transformanten ist im Vergleich zu Säuger- oder Insektenzelllinien mit einem äußerst geringen Aufwand verbunden und dementsprechend optimal für die Großproduktion

von Proteinen. Die Herstellung von humanem Insulin und dessen Analoga im industriellen Maßstab stellt ein prominentes Beispiel für die Produktion in Prokaryonten dar. Deshalb sollte auch versucht werden die LPS-Trap-Fc in diesem System zu produzieren.

#### 4.1.1.2.1 Klonierung der LPS-Trap-Fc in pET-22b(+)

Die LPS-Trap-Fc sollte zunächst in den für die Proteinproduktion in *E. coli* geeigneten Vektor pET-22b(+) kloniert werden. Der pET-22b(+) Vektor verfügt über einen T7 RNA Polymerase Promotor, der wiederum unter Kontrolle eines *lac* Operators steht. Zusätzlich verfügt das Plasmid über eine *pelB* Signalsequenz, die dafür sorgt, dass das zu produzierende Protein sich im periplasmatischen Raum des Bakteriums anreichert. Die LPS-Trap-Fc Sequenz wurde mit den Primern (4) und (12) aus pMT/Hygro/LPS-Trap-Fc amplifiziert. Über die Primer wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Sal*I eingefügt. Nach dem Verdau des Vektors bzw. des PCR-Produkts mit *Bam*HI und *Sal*I konnte die LPS-Trap-Fc Sequenz in das Leseraster der *pelB* Signalsequenz eingefügt werden.



**Abb. 4.5: LPS-Trap-Fc in pET-22b(+)**

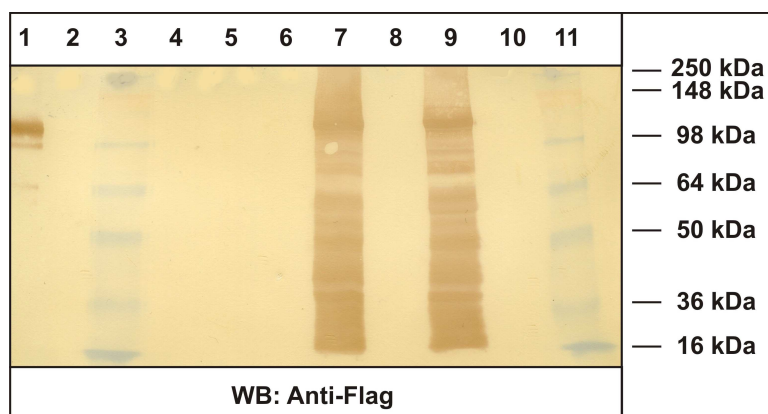
Die LPS-Trap-Fc Sequenz wurde in das Leseraster der *pelB* Signalsequenz kloniert. Die Expression steht unter Kontrolle eines T7 RNA Promotors und kann in den entsprechenden Bakterienstämmen mit IPTG induziert werden.

#### 4.1.1.2.2 Expression der LPS-Trap-Fc in BL21(DE3) pLysS

Die Produktion der LPS-Trap-Fc erfolgte in dem *E. coli* Derivat BL21(DE3) pLysS. Dieser Stamm besitzt das T7 Promotor Expressionssystem und ist defizient



für bestimmte Proteasen und Restriktionsenzyme. Das pLysS-Plasmid verhindert eine konstitutive Produktion des Proteins, die Genexpression wird erst durch IPTG Zugabe stimuliert.



**Abb. 4.6: Expression der LPS-Trap-Fc in *E. coli***

Mit pET-22b(+)/LPS-Trap-Fc transformierte BL21(DE3) pLysS wurden bis zu einer OD von 1,0 bei 600nm kultiviert. Darauf folgte eine 6- (Medium Spur 5, Zelllysate Spur 9) bzw. 12-stündige (Medium 2, Zelllysate 7) Stimulation mit IPTG. Die Spuren 4, 6 zeigen Kulturmedium und die Spuren 8, 10 Zelllysate von transformierten, nicht stimulierten Bakterien. Als Kontrolle diente gereinigte LPS-Trap-His (Spur 1).

BL21 Bakterien wurden mit pET-22b(+)/LPS-Trap-Fc mittels Elektroporation transformiert und bis zu einer optischen Dichte von 1,0 bei 600 nm kultiviert. Die Stimulation mit IPTG erfolgte 6 bzw. 12 h bei 37°C. Darauf wurden Kulturmedien und Zelllysate im Anti-Flag Western Blot analysiert. Erwartungsgemäß war in den Überständen stimulierter Bakterien keine LPS-Trap-Fc nachweisbar (Abb. 4.6, Spur 2 und 5). In den Zelllysaten stimulierter Bakterien hingegen konnte die Hauptbande des Fusionsproteins bei ca. 120 kDa detektiert werden (Abb. 4.6, Spur 7 und 9). Ferner waren noch etliche Banden von Abbauprodukten der LPS-Trap-Fc nachweisbar, was auf eine starke Proteaseaktivität der Bakterien hinweist. Die verringerte Größe der LPS-Trap-Fc um ca. 10 kDa gegenüber dem in Insektenzellen produzierten Fusionsprotein erklärt sich durch die fehlende Verzuckerung des Proteins in Bakterien. Als Kontrolle diente gereinigte LPS-Trap-His (12,5 µg/ml) bzw. Medien und Zelllysate unstimulierter BL21 (Abb. 4.6, Spur 1 bzw. 4, 6, 8, 10) Trotz der zu erwartenden hohen Ausbeuten wurde von einer weiteren Verwendung eines bakteriellen Expressionssystems abgesehen, da die Aufarbeitung der LPS-Trap-Fc aus Zelllysaten bis zum biologisch aktiven Protein aufgrund der fehlenden Verzuckerung sich vermutlich sehr aufwendig gestaltet hätte. Des Weiteren ist eine

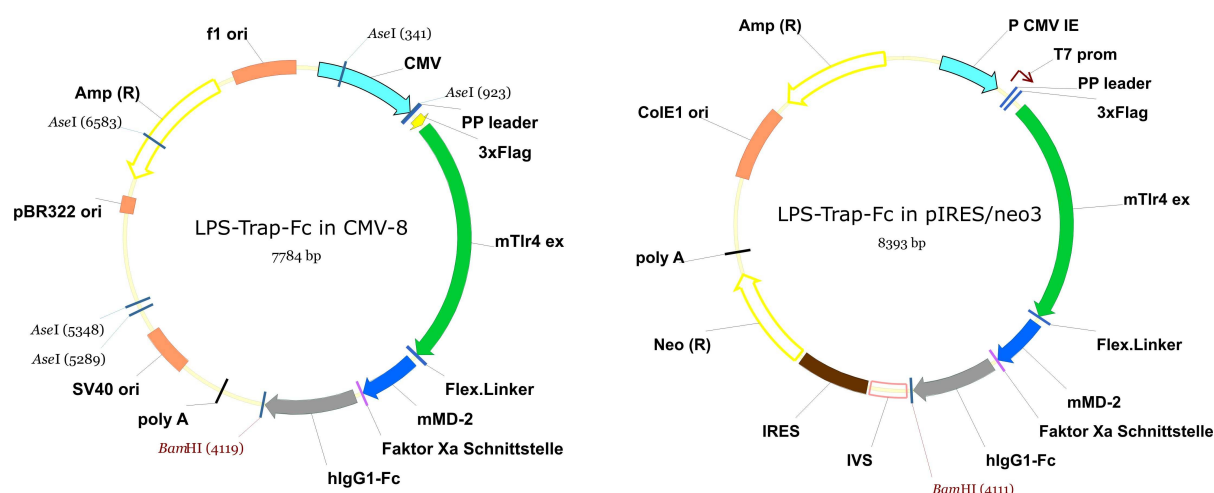
unverhältnismäßig hohe Endotoxinkontamination bei der Reinigung aus bakteriellen Zelllysaten zu erwarten.

#### 4.1.1.3 QBI293A-Zellen

Säugerzelllinien werden in der Industrie häufig für die Produktion rekombinanter Proteine genutzt. Die Proteine werden häufig in richtiger Faltung und natürlichem Glykosylierungsmuster produziert. Für die Produktion wurden daher QBI293A-Zellen, ein Ableger der HEK293 Zelllinie, getestet werden.

##### 4.1.1.3.1 Klonierung der LPS-Trap-Fc in pIRESneo3

Um das Protein in größeren Mengen zu produzieren, sollte auf das pIRESneo3-Expressionssystem zurückgegriffen werden. Der Vektor pIRESneo3 verfügt über einen CMV-Promotor und eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), welche die Translation von zwei offenen Leserastern aus einer mRNA ermöglicht. Das zweite Leseraster des Vektors enthält das Gen *NPT-II*, welches Resistenz gegen Antibiotika der Aminoglycosid-Klasse vermittelt. So kann auf die Überprüfung einzelner Zellklone verzichtet und ein Selektionsdruck ausgeübt werden, der zu einer optimierten Proteinproduktion führen sollte.



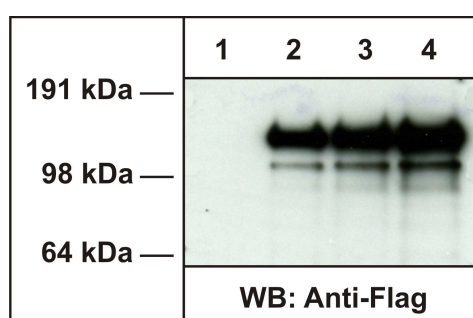
**Abb. 4.7: LPS-Trap-Fc in p3xFlag-CMV-8 und pIRES/neo3**

Die LPS-Trap-Fc Sequenz wurde gemeinsam mit der Preprotrypsin Signalsequenz aus dem CMV-8 Plasmid geschnitten und in den Vektor pIRESneo3 ligiert. Die IRES Sequenz sorgt für eine parallele Expression des Resistenz- und Zielgens.

Für die Klonierung von pIRESneo3/LPS-Trap-Fc wurde der Vektor CMV-8/LPS-Trap-Fc mit dem Restriktionsenzym *AseI* verdaut und die entstanden 5'-Überhänge mit Hilfe des Klenow-Fragment-Enzyms aufgefüllt. Anschließend wurde das Fragment mit *BamHI* geschnitten. Dadurch konnte die LPS-Trap-Fc zusammen mit der Preprotrypsin-Signalsequenz in den mit *EcoRV* und *BamHI* verdauten Vektor pIRESneo3 kloniert werden (Abb. 4.7).

#### 4.1.1.3.2 Expression der LPS-Trap-Fc in QBI293A

Die Expression der LPS-Trap-Fc wurde nach der Transfektion der Zellen und 14-tägiger Selektion mit G418 im Anti-Flag Western Blot überprüft. In den Zellkulturüberständen konnte die LPS-Trap-Fc bei ca. 140 kDa nachgewiesen werden. Ferner konnte eine Abhängigkeit der Proteinproduktion von der Antibiotikakonzentration festgestellt werden (Abb. 4.8, Spur 2: 500 µg/ml, 3: 1 mg/ml, 4: 2 mg/ml). Die erhoffte Steigerung der Ausbeute im pIRES Expressionssystem konnte im vergrößerten Maßstab unter serumfreien Bedingungen nicht erreicht werden. Es wurden lediglich 0,5 µg/ml Protein im Überstand festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die erfolgreiche Expression in Säugerzellen stellte allerdings die Grundlage für die Untersuchungen über die Opsonisierungseigenschaften der LPS-Traps-Fc1-4 (siehe 4.3), da mit diesem System über lange Zeit konstante Proteinmengen produziert werden konnten.



**Abb. 4.8: Expression der LPS-Trap-Fc in QBI293A**

Überstände von pIRESneo3/LPS-Trap-Fc (Spur 2-4) oder Kontrollvektor (Spur 1) transfizierten QBI293A wurden auf die LPS-Trap-Fc Produktion im Anti-Flag Western Blot analysiert.

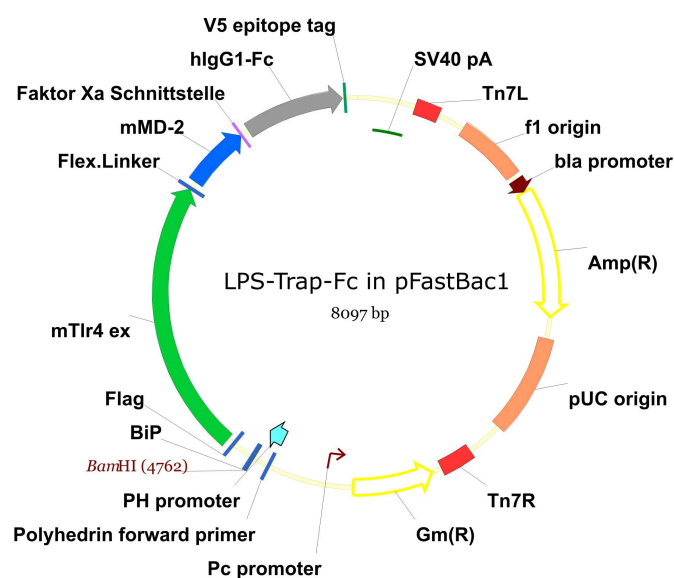
#### 4.1.1.4 Baculovirussystem

Das Baculovirus Expressionssystem ist durch unkomplizierte Zellkultivierung, hohe Transfektionsraten und Proteinausbeuten hervorragend für die Großproduktion

von rekombinanten Proteinen geeignet. Da das Baculovirus *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV) ausschließlich für Insekten infektiös ist, müssen keine besonderen Schutzmaßnahmen getroffen werden.

#### 4.1.1.4.1 Klonierung der LPS-Trap-Fc in pFastBac1

Die rekombinanten Baculoviren wurden mit Hilfe des Bac to Bac<sup>®</sup> Baculovirus Expressionssystem generiert. Hierfür wurde die LPS-Trap-Fc DNA einschließlich der BiP-Signalsequenz aus dem Vektor pMT/Hygro/LPS-Trap-Fc über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pme*I ausgeschnitten und in den Transfervektor pFastBac1 kloniert (Abb. 4.9). Das pFastBac1/LPS-Trap-Fc Donorplasmid wurde in DH10Bac *E. coli* transformiert. Dieser Bakterienstamm enthält sowohl ein Bacmid, das die virale DNA enthält und als Shuttlevektor dient, als auch ein Helfer-Plasmid, das für eine Transposase kodiert. In den Bakterien findet mit Hilfe der Transposase eine gerichtete Rekombination zwischen dem Shuttle- und Transfervektor statt. Die rekombinante Bacmid DNA konnte anschließend vermehrt und isoliert werden.



**Abb. 4.9: LPS-Trap-Fc in pFastBac1**

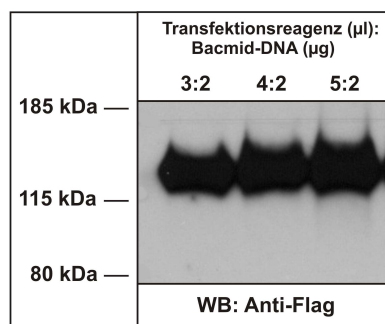
Die LPS-Trap-Fc DNA wurde zusammen mit der BiP-Signalsequenz aus pMT/Hygro ausgeschnitten und in den Transfervektor pFastBac1 kloniert. Über die Tn7 Sequenzen kann eine Transposase die LPS-Trap-Fc Sequenz gerichtet in das Baculovirus-Bacmid transferieren.

#### 4.1.1.4.2 Expression der LPS-Trap-Fc in Sf-21 und High Five<sup>™</sup> Zellen

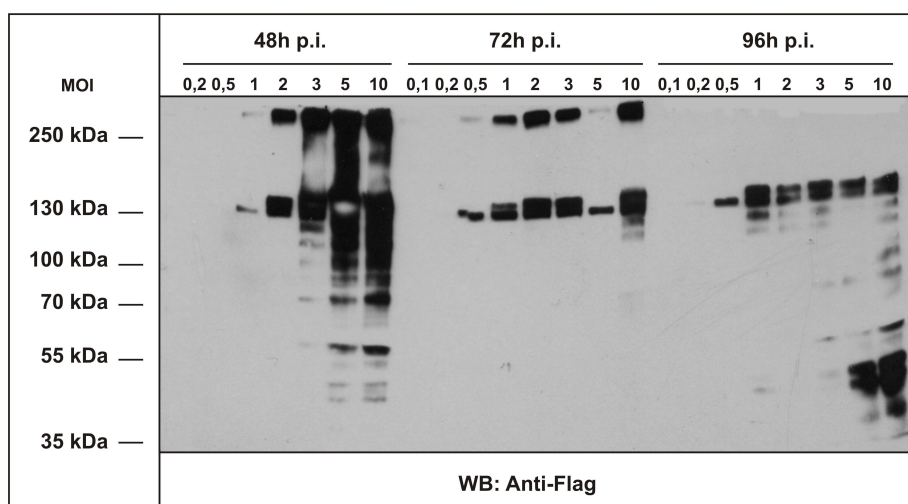
Die gewonnene Bacmid DNA wurde in Sf-21 Insektenzellen transfiziert. Bereits nach 24 h konnte eine erfolgreiche Transfektion über die veränderte

Morphologie der Zellen festgestellt werden. Nach weiteren drei Tagen waren die Insektenzellen durch das Virus vollständig lysiert. Die Zellüberstände wurden auf die Produktion des rekombinanten Proteins im Anti-Flag Western Blot überprüft. Die Baculovirus produzierte LPS-Trap-Fc zeigte wie das in S2-Zellen produzierte Fusionsprotein eine Masse von ca. 130 kDa (Abb. 4.10, A).

A



B



**Abb. 4.10: Produktion der LPS-Trap-Fc im Baculovirus Expressionssystem**

(A) Sf-21-Zellen wurden mit rekombinanter Bacmid-DNA in unterschiedlichen Verhältnissen transfiziert. Nach 4 Tagen wurden die Überstände auf die Expression der LPS-Trap-Fc im Western Blot untersucht. Für die Detektion wurde ein Anti-Flag Antikörper verwendet.

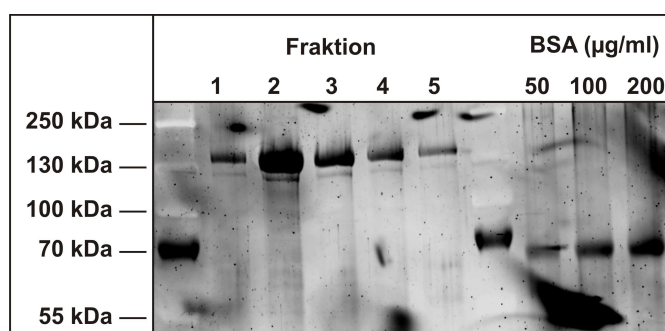
(B) High Five™-Zellen wurden mit rekombinanten Baculoviren in steigenden MOIs infiziert. Nach 48 h, 72 h und 96 h wurden Zellüberstände auf die LPS-Trap-Fc Produktion im Anti-Flag-Western Blot getestet.

Nach der Amplifizierung der Viren zu einem hohtitigen Stock in Sf-21-Zellen sollte die Proteinproduktion in High Five™-Zellen getestet werden. Die Verwendung dieser Zelllinie aus *Trichoplusia ni* führt üblicherweise zu erhöhten Ausbeuten von sezernierten Proteinen. High Five™-Zellen wurden mit steigenden MOIs infiziert und

die Produktion der LPS-Trap-Fc zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (p.i.) überprüft. Im Anti-Flag Western Blot zeigte sich deutlich, dass bei MOIs zwischen drei und zehn bereits nach 48 h eine hohe Konzentration an Fusionsprotein im Überstand vorhanden ist (Abb. 4.10, B). Nach 72 bzw. 96 h sank die Menge an LPS-Trap-Fc kontinuierlich und stark ab (Abb. 4.10, B). Erste Abbauprodukte waren schon nach 48 h deutlich im Western Blot zu erkennen. Die bei hohen MOIs vollständig lysierten Zellen haben demnach eine hohe Konzentration an Proteasen im Überstand zur Folge, die zu einem rapiden Abbau der Fusionsproteine führen.

#### 4.1.1.4.3 Reinigung der LPS-Trap-Fc

Um die Ausbeute an Fusionsprotein im Baculovirus System zu überprüfen, wurden High Five™ Zellen in einem größeren Ansatz mit einer MOI von zehn infiziert. Die LPS-Trap-Fc wurde 48 h p.i. über eine Protein G Säule direkt aus den Überständen isoliert. Die Elution erfolgte wiederum mit 0,1 M Glycin/HCl-Puffer pH 2,8. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels einer SDS-Page aufgetrennt und das Gel direkt mit Sypro-Red angefärbt. Die LPS-Trap-Fc Banden bei 130 kDa ließen auf eine Ausbeute von insgesamt 1 bis 1,5 mg schließen. Dies entspräche 5 bis 7,5 µg/ml Fusionsprotein im Überstand. Weiterhin konnten nur sehr schwache Banden verschmutzender Proteine in den Eluaten festgestellt werden.



**Abb. 4.11: LPS-Trap-Fc nach Reinigung über eine Protein G Säule**

Überstände von mit LPS-Trap-Fc exprimierenden Baculoviren infizierten High Five™-Zellen wurden über eine Protein G Säule gereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mit Sypro Red gefärbt. Die Menge an gewonnenem Protein konnte mit einem BSA-Standard ermittelt werden.

Das Baculovirus-Expressionssystem kristallisierte sich als das am besten geeignete System für die Großproduktion heraus. Für kleinere Ansätze sollte das einfachere *Drosophila*-Expressionssystem genutzt werden.

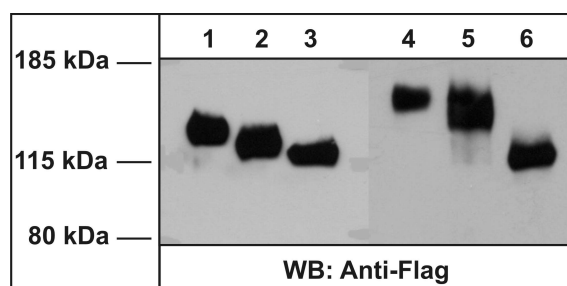


### 4.1.2 Charakterisierung der LPS-Trap-Fc

In den folgenden Untersuchungen sollten die biochemischen Eigenschaften und die biologischen Aktivität der LPS-Trap-Fc genauer charakterisiert werden.

#### 4.1.2.1 Unterschiede in der Glykosylierung in Abhängigkeit vom Expressionssystem

Die LPS-Trap-Fc wies abhängig vom gewählten Expressionssystem auffällige Größenunterschiede auf (siehe 4.1.1.1.2 und 4.1.1.2.2). Die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster von Insekten- und Säugerzellen könnten die Ursache für dieses Phänomen sein. Um dies zu überprüfen, wurden Überstände von S2- und QBI293A-Transfektanten mit Glykosidasen versetzt, anschließend im SDS-Gel aufgetrennt und mit einem Anti-Flag-Antikörper detektiert. Der Verdau mit Endoglykosidase H (Endo H) reduzierte die Masse der LPS-Trap-Fc aus S2-Transfektanten von 130 kDa (Abb. 4.12, Spur 1) auf ca. 120 kDa (Spur 2), während die LPS-Trap-Fc aus QBI293A-Transfektanten (Spur 4) nur partiell verdaut und der Masseverlust geringer ausfiel (Spur 5). Dies entsprach den Erwartungen, da Endo H den Chitobiosekern nur spaltet, wenn große Mannosereste im Zucker vorliegen [126]. Die Glykosylierungen in Insektenzellen weisen überdurchschnittlich viele Mannosereste auf [127].



**Abb. 4.12: Größenmuster der LPS-Trap-Fc nach Glykosidasenverdau**

Überstände von LPS-Trap-Fc S2- (linke Hälfte) und QBI293A-Transfektanten (rechte Hälfte) wurden mit Endo H (Spur 2, 4) oder PNGase F (Spur 3, 6) verdaut. Nach der Auftrennung im SDS-Gel, konnten die Proben im Anti-Flag Western Blot identifiziert werden. Unbehandelte Überstände dienen als Kontrollen (Spur 1, 4).

Durch Behandlung mit Peptid N-Glykosidase F (PNGase F) wurden die Zucker der LPS-Trap-Fc sowohl aus S2- als auch aus QBI293A-Transfektanten vollständig verdaut, was im Western Blot durch die Reduktion auf das berechnete

Molekulargewicht von 115 kDa bzw. 117 kDa sichtbar wurde (Abb. 4.12, Spur 3 und 6). Die Größenunterschiede waren also ausschließlich auf die unterschiedliche Verzuckerungen in den jeweiligen Wirtszellen zurückzuführen.

#### **4.1.2.2 Untersuchung der LPS-Bindungsfähigkeit**

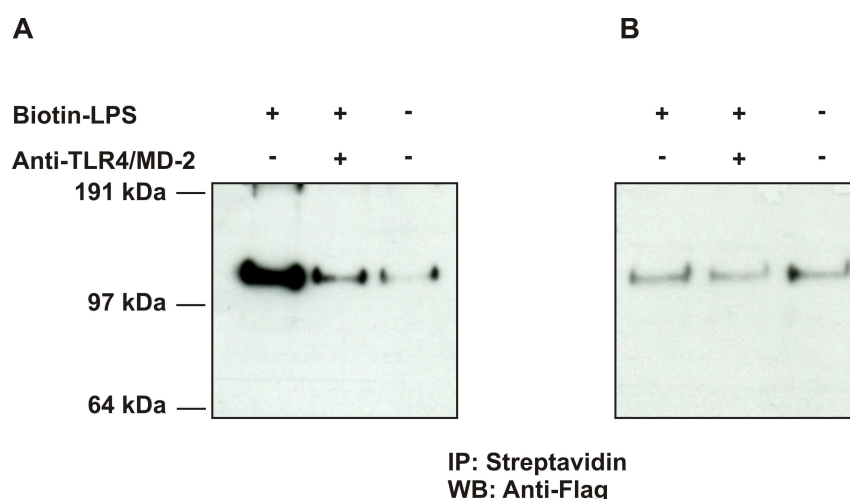
Um die tatsächliche Interaktion der LPS-Trap-Fc mit LPS zu untersuchen wurde ein LPS Pull-down-Assay durchgeführt [33].

Hierfür wurden jeweils 2 ml LPS-Trap-Fc-haltiger Zellüberstand von S2-Transfektanten 1 h mit biotinyliertem LPS bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert. Das Präzipitat wurde gewaschen, in Laemmli-Puffer gekocht und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Bande der LPS-Trap-Fc konnte über das Flag-Peptid im Western Blot identifiziert werden (Abb. 4.13, A). Biotinyliertes LPS wurde folglich durch das Fusionsprotein gebunden und koimmunpräzipitiert. Als Negativkontrolle dienten LPS-Trap-Fc-haltige Überstände, die nicht mit Biotin-LPS versetzt wurden.

Zur Kontrolle der richtigen Konformation der LPS-Trap-Fc wurden Proben mit einem neutralisierenden Anti-TLR4/MD2-Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml 1 h vorinkubiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an den TLR4/MD-2 Komplex und verhinderte die Präzipitation der LPS-Trap-Fc durch das biotinylierte LPS (Abb. 4.13, A). Demnach bildete die LPS-Trap-Fc den essentiellen TLR4/MD-2 Komplex und die Bindung des LPS kann durch den Antikörper neutralisiert werden. In QBI293A produzierte LPS-Trap-Fc zeigte identische Eigenschaften (siehe 4.3.3)

Über das gleiche Verfahren sollte die LPS-Bindung an gereinigter LPS-Trap-Fc nachgewiesen werden. Die Versuchsansätze enthielten 2 µg/ml LPS-Trap-Fc. Für die Vermittlung der LPS-Bindung wurde noch 20% FCS zugesetzt. Überraschenderweise konnte aber keine Interaktion der LPS-Trap-Fc mit LPS festgestellt werden (Abb. 4.13, B). Zugabe von rekombinantem LBP und CD14 führte ebenfalls nicht zu einer Bindung von LPS (Daten nicht gezeigt). Demzufolge wurde die Konformation der LPS-Trap-Fc während des Reinigungsvorgangs so verändert, dass sie zum vollständigen Verlust ihrer in nativer Form vorhandenen LPS-Bindungsfähigkeit führte.





**Abb. 4.13: LPS-Pull-down aus LPS-Trap-Fc-haltigen Überständen und gereinigter LPS-Trap-Fc**

Überstände von LPS-Trap-Fc transfizierten S2-Zellen (A) oder 2 µg/ml gereinigte LPS-Trap-Fc (B) wurden mit Biotin-LPS in Anwesenheit von 20% FCS inkubiert und anschließend mit Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert (linke Spuren). Als Kontrolle wurden Überstände zusätzlich mit Anti-TLR4/MD-2 vorgeblockt (mittlere Spuren) oder kein Biotin-LPS zugegeben (rechte Spuren). Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Detektion erfolgte im Anti-Flag Western Blot.

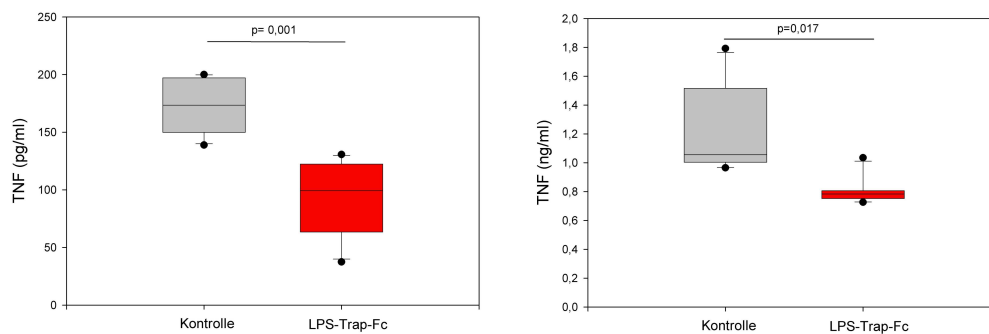
#### 4.1.2.3 Inhibitorische Aktivität der LPS-Trap-Fc *in vitro*

Nach der Überprüfung der LPS-Bindung sollte im nächsten Schritt die biologische Aktivität der LPS-Trap-Fc *in vitro* getestet werden. Um das Fusionsprotein in seiner nativen Form zu überprüfen, wurde ein Transwell-System verwendet. HEK293T-Zellen wurden 8 h nach ihrer Transfektion mit einem CMV8/LPS-Trap-Fc Expressionsvektor in 24-well Platten ausgesät. Zusätzlich wurden Transwells eingesetzt, die mit Zellen der Makrophagen-ähnlichen Mauszelllinie RAW264.7 beladen wurden. Nach einer 48-stündigen Kokultivierung, wurden die Zellen mit 5 ng/ml bzw. 50 ng/ml LPS stimuliert und nach weiteren 4 h die TNF-Konzentrationen im Überstand mittels ELISA vermessen. LPS-Trap-Fc transfizierte Zellen zeigten bei beiden LPS-Konzentrationen signifikant geringere TNF-Spiegel im Überstand als Kontrollvektor transfizierte HEK293T (Abb. 4.14, A).

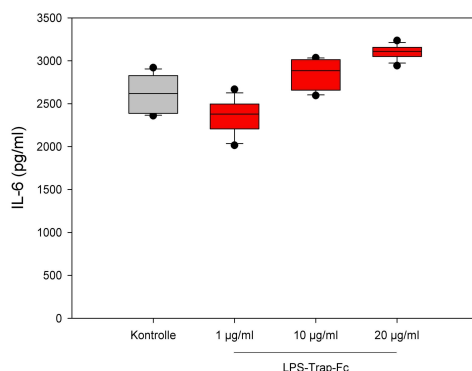
Trotz des fehlenden Nachweises der LPS-Bindung im „LPS Pull-down“-Assay, sollte auch die biologische Aktivität der gereinigten LPS-Trap-Fc im Zellmodell überprüft werden. Hierfür wurden monozytische Mono Mac 6 (MM6)-Zellen in eine 48-well Platte ausgesät und mit steigenden Konzentration (1 µg/ml, 10 µg/ml und 20 µg/ml) an LPS-Trap-Fc oder PBS als Kontrolle versetzt. Die Stimulation erfolgte mit 100 ng/ml LPS über Nacht. Der durch ELISA bestimmte IL-6-Spiegel im Überstand konnte durch die gereinigte LPS-Trap-Fc in keinem Fall vermindert werden (Abb.

4.14, B). Es war im Gegenteil ein leichter konzentrationsabhängiger Anstieg der Stimulierung sichtbar, der aber nicht signifikant war. Bei der Testung der biologischen Aktivität bestätigte sich daher die Vermutung, dass nur native LPS-Trap-Fc aktiv ist, während das gereinigte Fusionsprotein seine inhibitorische Aktivität verlor.

**A**



**B**



**Abb. 4.14: Biologische Aktivität von nativer und gereinigter LPS-Trap-Fc**

(A) HEK293T-Zellen, transfiziert mit LPS-Trap-Fc oder Kontrollvektor, wurden in einer 24-well Platte ausgesät und 48h mit RAW 284.7-Zellen in Transwells kokultiviert. Die Zellen wurden mit 5 ng/ml (linke Abbildung) bzw. 50 ng/ml (rechte Abbildung) LPS stimuliert. Nach 4h wurde TNF im Überstand mittels ELISA vermessen.  $p=0,001$  bzw.  $p=0,017$  (Mann-Whitney-U-Test),  $n=6$

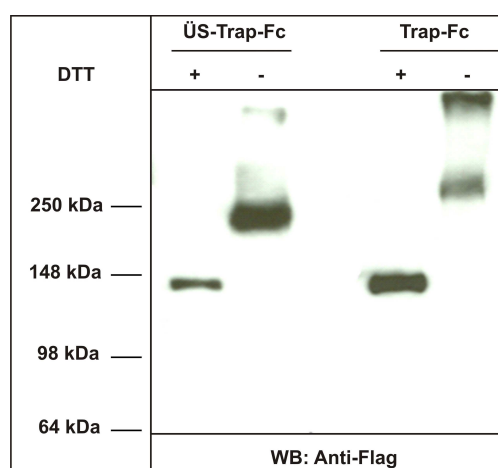
(B) Mono Mac 6-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an gereinigter LPS-Trap-Fc inkubiert. Die Stimulation erfolgte mit 100 ng/ml LPS über Nacht. Die IL-6 Konzentration im Zellüberstand wurde per ELISA bestimmt.

#### 4.1.2.4 Untersuchung alternativer Reinigungsmethoden für die LPS-Trap-Fc

Aufgrund des Aktivitätsverlustes nach der Isolierung der LPS-Trap-Fc aus Zellüberständen sollte das Fusionsprotein vor und nach der Reinigung genauer charakterisiert und gegebenenfalls alternative Reinigungsverfahren getestet werden.

#### 4.1.2.4.1 Oligomerisierung der LPS-Trap-Fc während der Reinigung

Sowohl die LPS-Trap-His als auch die LPS-Trap-Fc neigen zu Oligomerenbildung [120]. Die LPS-Trap-Fc sollte nun unter nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht werden. Hierfür wurde Zellüberstand LPS-Trap-Fc produzierender S2 Zellen mit über Protein G gereinigter LPS-Trap-Fc im Anti-Flag Western Blot verglichen. Unter reduzierenden Bedingungen (plus DTT) konnte die LPS-Trap-Fc-Bande in beiden Fällen wie erwartet bei 130 kDa detektiert werden (Abb. 4.15). Beim Verzicht auf DTT hingegen zeigte sich ein unterschiedliches Bild: Während die LPS-Trap-Fc im Überstand als IgG-Fc-Dimer vorlag, setzte sich das gereinigte Fusionsprotein überwiegend aus Oligomeren zusammen (Abb. 4.15), die teilweise aufgrund ihrer Größe nicht das Trenngel erreichten und im Sammelgel verblieben.



**Abb. 4.15: Vergleich von gereinigter mit nativer LPS-Trap-Fc**

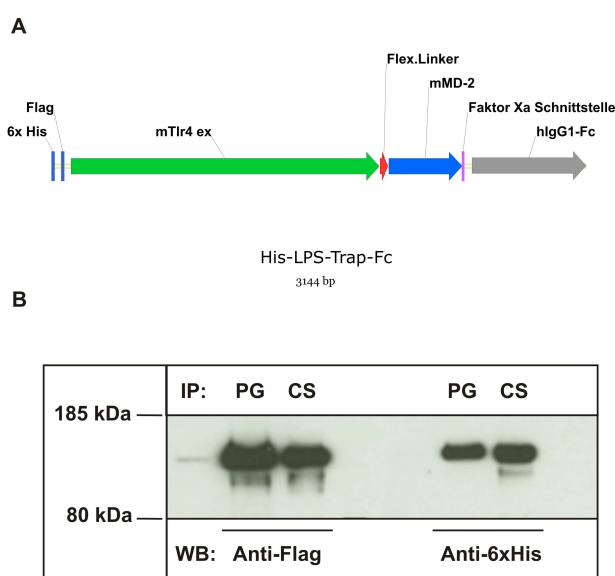
Überstände von LPS-Trap-Fc transfizierten Zellen (ÜS-Trap-Fc) und gereinigte LPS-Trap-Fc (Trap-Fc) wurden unter reduzierenden (+ DTT) bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen über ein SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch einen Anti-Flag Antikörper.

Da nur die monomere Form des Fusionsproteins LPS bindet [120], konnte der Aktivitätsverlust auf die Oligomerisierung während der Reinigung zurückgeführt werden. Der für die Stabilität und Struktur des Proteins kritischste Schritt der Reinigung stellt die Elution bei einem pH von 2,8 dar. Wurde die LPS-Trap-Fc unter schonenderen Bedingungen bei pH 4,0 oder in Gegenwart von BSA als Schutzprotein eluiert, zeigte sich aber ein identisches Bild im Western Blot (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2.4.2 Konstruktion und Expression der His-LPS-Trap-Fc

Für die Überprüfung alternativer Reinigungsmethoden sollte ein 6xHis-Peptid N-terminal in die LPS-Trap-Fc eingebracht werden. Über diesen Marker wäre eine weit schonendere Isolierung im leicht basischen Milieu analog zur Reinigung der LPS-Trap-His möglich.

Der Vektor pMT/Hygro/LPS-Trap-Fc wurde mit den Restriktionsenzymen *SfiI* in der Mitte der BiP-Signalsequenz und mit *EcoRV* kurz vor der Flag-Sequenz der LPS-Trap-Fc geschnitten. Der fehlende Teil der BiP-Signalsequenz und die 6xHis-Sequenz konnten anschließend über die Oligonukleotide (5) und (6) eingefügt werden (Abb. 4.16, A).



**Abb. 4.16: Konstruktion der His-LPS-Trap-Fc**

(A) Über ein Oligonukleotid wurde in den Vektor pMT/Hygro/LPS-Trap-Fc ein 6xHis-Tag an den N-Terminus der LPS-Trap-Fc eingefügt.

(B) Die His-LPS-Trap-Fc wurde aus Überständen von transfizierten S2-Zellen entweder mit Protein G (PG) oder chelatierender Sepharose (CS) immunpräzipitiert. Der Nachweis erfolgte im Western Blot mit einem Anti-Flag oder Anti-6xHis Antikörper.

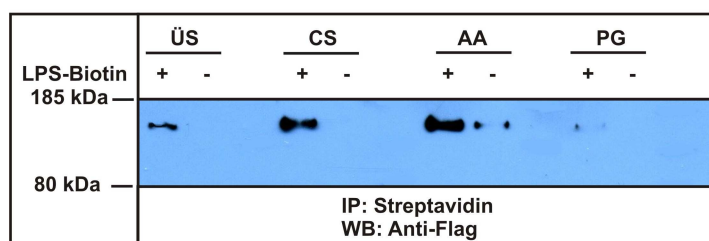
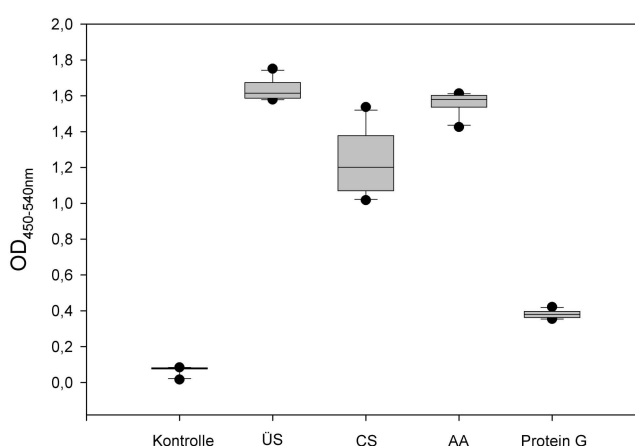
Im nächsten Schritt sollte die Expression und Funktion des 6xHis-Tags überprüft werden. Hierfür wurde die His-LPS-Trap-Fc entweder über das Fc-Fragment (Protein G) oder das His-Peptid (chelatisierende Sepharose) aus Überständen isoliert. Im Anti-Flag und im Anti-His Western Blot konnte die His-LPS-Trap-Fc bei ca. 130 kDa detektiert werden (Abb. 4.16, B). Dies bedeutete, dass sowohl der N- als auch der C-terminale Tag der His-LPS-Trap-Fc funktionsfähig waren.

#### **4.1.2.4.3 Einfluss unterschiedlicher Reinigungsmethoden auf die LPS-Bindungsfähigkeit**

Die His-LPS-Trap-Fc ermöglichte einen genaueren Vergleich der verschiedenen Reinigungsmethoden für das Fusionsprotein. Die His-LPS-Trap-Fc wurde aus den Überständen produzierender S2-Zellen entweder mit chelatierender Sepharose (CS) oder Protein G (PG) gefällt und entsprechend mit 300 mM Imidazol pH 8,0 oder 0,1 M Glycin/HCl pH 4,0 eluiert. Alternativ wurde das Fusionsprotein (IEP 6,04) über eine Anionenaustauscher-Säule aus dem Überstand isoliert und anschließend mit 1,0 M TRIS-HCl pH 8,8 aus der Säule eluiert. Anschließend wurden alle Eluate gegen PBS dialysiert und ein „LPS Pull-down“-Assay in Anwesenheit von 20% FCS durchgeführt (vgl. 4.1.2.2). Im Anti-Flag Western Blot wurde deutlich, dass die His-LPS-Trap-Fc nach der Isolierung über chelatierende Sepharose (CS) und Anionenaustauscher (AA) wie im nativen Zustand (ÜS) ihre LPS-Bindungsfähigkeit erhalten konnte (Abb. 4.17, A). Nach der Reinigung über Protein G (PG) hingegen war die Bande der His-LPS-Trap-Fc nur sehr schwach zu erkennen, was auf eine insgesamt geringe Interaktion mit LPS hinwies (Abb. 4.17, B).

Da im Western Blot nur qualitative Aussagen über die LPS-Bindungsfähigkeit getroffen werden konnten, sollte ein LPS-Bindungstest auf der Basis eines ELISAs etabliert werden. Zunächst sollten die Mengen an Fusionsprotein in den einzelnen Eluatzen gegen den Überstand abgeglichen werden. Eine ELISA-Platte wurde mit einem Anti-Flag-Antikörper beschichtet und die Eluate bzw. der Überstand auf die Platte titriert. Die Menge an enthaltener His-LPS-Trap-Fc konnte anschließend mittels eines Anti-IgG-Fc Antikörpers bestimmt werden.

Das Fusionsprotein konnte nun in exakt gleichen Mengen auf eine Anti-Flag Antikörper beschichtete ELISA-Platte aufgetragen werden. Sodann wurde das gebundene Fusionsprotein mit LPS-Biotin (0,5 µg/ml) in PBS plus 20% FCS inkubiert. Die Detektion erfolgte mit HRP-gekoppeltem Streptavidin. Im LPS-Bindungs-ELISA konnte deutlich gezeigt werden, dass natives Fusionsprotein (ÜS) die höchste Affinität zu LPS besitzt (Abb. 4.17, B). Die Bindung an unter basischen Bedingungen gereinigtem Protein (AA, CS) war nur unwesentlich geringer (Abb. 4.17, B). Die über Protein G isolierte His-LPS-Trap-Fc zeigte hingegen nur eine schwach über Kontrollniveau liegende Bindung von LPS. Durch eine Isolierung des Fusionsproteins im leicht basischen Milieu konnte somit die LPS-Bindungsaktivität erhalten werden.

**A****B**

**Abb. 4.17: His-LPS-Trap-Fc behält seine LPS-Bindungsfähigkeit nach Reinigung im basischen Milieu**

(A) Über chelatierende Sepharose (CS), Anionenaustauscher (AA) oder Protein G (PG) isolierte His-LPS-Trap-Fc bzw. Fusionsprotein enthaltende Überstände (ÜS) wurden mit Biotin-LPS inkubiert und anschließend mit Streptavidin immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden im Anti-Flag Western Blot analysiert.

(B) Anti-Flag beschichtete ELISA-Platten wurden mit identischen Mengen an Fusionsprotein inkubiert. Die Bindung von biotinyliertem LPS an die einzelnen Fraktionen (siehe A) wurde über Streptavidin-HRP bestimmt.

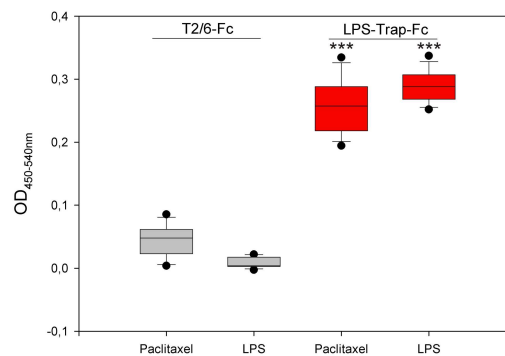
## 4.2 Untersuchung weiterer Liganden für die LPS-Trap

Die postulierte Überlegenheit der LPS-Trap gegenüber anderen Anti-Endotoxin-Strategien begründet sich mit der Eigenschaft, nicht nur die Wirkung von LPS zu hemmen, sondern auch Effekte weiterer Mediatoren zu antagonisieren. Für TLR4 ist eine Reihe bakterieller, viraler, aber auch körpereigener Liganden beschrieben [107-109]. In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob auch die LPS-Trap die Fähigkeit besitzt weitere Strukturen über LPS hinaus zu binden.

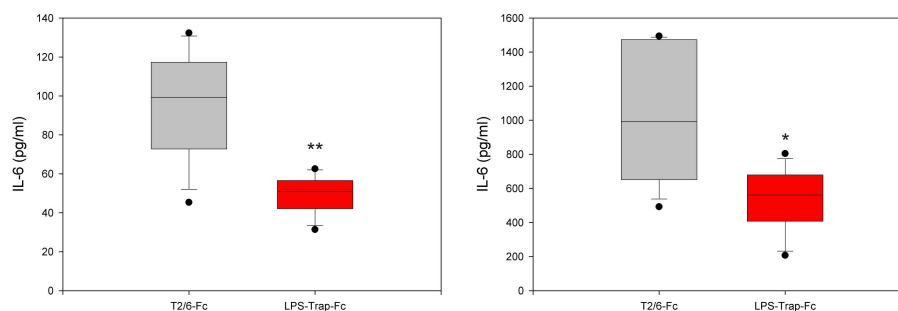
#### 4.2.1 Bindung und Hemmung von Paclitaxel durch die LPS-Trap-Fc

Der mitosehemmende und antiangiogene Naturstoff Paclitaxel (Taxol®) gehört neben LPS zu den am besten beschriebenen Liganden für TLR4. Während die Bindung und Signaltransduktion an Maus-TLR4/MD-2 als gesichert gilt, bleiben die über humanem TLR4 vermittelten Effekte umstritten [119; 128]. Die Bindung von Paclitaxel erfolgt analog zu LPS ebenfalls an MD-2, wobei sowohl murines als auch humanes MD-2 mit Paclitaxel interagieren [129].

**A**



**B**



**Abb. 4.18: Bindung und Hemmung von Paclitaxel durch die LPS-Trap-Fc**

(A) Paclitaxel bzw. LPS beschichtete ELISA-Platten wurden mit Überständen von LPS-Trap-Fc (rot) bzw. T2/6-Fc (grau) transfizierten QBI293A inkubiert. Die Bindung der Fusionsproteine wurde über einen HRP-gekoppelten Anti-hlgG-Fc, darauffolgender chromogener Reaktion im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450-540 nm quantifiziert. \*\*\*  $p < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test,  $n=8$

(B) Mit LPS-Trap-Fc (rot) bzw. T2/6-Fc (grau) produzierende QBI293A wurden mit RAW 264.7-Zellen 48 h kokultiviert. Die Zellen wurden mit 1 µM (linke Abb.) und 10 µM Paclitaxel (rechte Abb.) über Nacht stimuliert und IL-6 im Überstand per ELISA vermessen. \*  $p=0,028$ , \*\*  $p=0,005$ , Mann-Whitney-U-Test,  $n=8$

Die Assoziation von Paclitaxel zur LPS-Trap sollte zunächst in einem Bindungsassay überprüft werden. Hierfür wurden 10 µM Paclitaxel bzw. 10 µg/ml LPS über Nacht auf eine ELISA-Platte beschichtet und anschließend mit LPS-Trap-Fc bzw. T2/6-Fc (siehe 4.6.1) -haltigen QBI293A-Überständen inkubiert. Die Detektion der gebundenen Fusionsproteine erfolgte mit einem Anti-hlgG-Fc

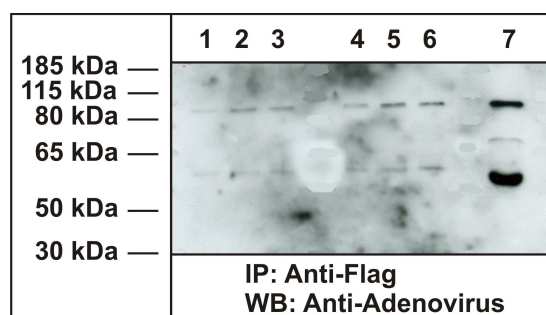


Antikörper. Die LPS-Trap-Fc interagiert im Gegensatz zur T2/6-Fc sowohl mit fixiertem LPS als auch mit Paclitaxel (Abb. 4.18, A)

Über die reine Bindung von Paclitaxel hinaus sollte die Aktivität der LPS-Trap-Fc zusätzlich noch in einem Stimulationsmodell getestet werden, um die kompetitive Wirkung gegenüber den zellständigen Rezeptoren zu belegen. Im Transwell-Modell wurden stabil mit LPS-Trap-Fc oder T2/6-Fc transfizierte QBI293A mit RAW 264.7 in Transwells 48 h kokultiviert, anschließend über Nacht mit 1  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M Paclitaxel stimuliert und die IL-6 Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen. In LPS-Trap-Fc-haltige Überstände konnte eine signifikant geringere IL-6 Ausschüttung als in Kontrollüberstände festgestellt werden (Abb. 4.18, B). Das Fusionsprotein ist folglich nicht nur in der Lage Paclitaxel zu binden, sondern kann auch eine Paclitaxel-induzierte proinflammatorische Reaktion *in vitro* kompetitiv hemmen.

#### 4.2.2 Untersuchung zur Bindung der LPS-Trap an Adenoviren

Für die Isolierung rekombinanter Adenoviren können neben der Reinigung über einen CsCl-Gradienten auch chromatographische Methoden verwendet werden. Hierfür nutzt man adsorbierende Membranen, die selektiv an adenovirale Partikel binden. In Folge der Reinigung der Ad-LPS-Trap-Fc-Partikel aus QBI293A-Zellen und Überständen mit Hilfe derartiger Membranen wurden im Gegensatz zu Ad- $\beta$ -Gal-Partikeln nur zehn Prozent der erwarteten Virentiter erzielt. Da die Interaktion dreier Virenstämme (RSV, VSV und MMTV) [130-132] mit TLR4 beschrieben ist, sollte untersucht werden, ob das Fusionsprotein Adenoviren möglicherweise durch Bindung an Hüllproteine für die adsorbierenden Membranen maskiert.



**Abb. 4.19: Immunpräzipitation von adenoviralen Zellüberständen**

Ad- $\beta$ -Gal-haltige Überstände wurden mit 0, 1, 0,5 und 1,0  $\mu$ g/ml LPS-Trap-His (Spur 1, 2, 3) inkubiert. Das Fusionsprotein wurde mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und im SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch einen Anti-Adenovirus Antikörper. Zum Vergleich wurden Kontrollpräzipitate unbehandelter Überstände (Spur 4-6) und direkt aufgetragener Überstand (Spur 7) verwendet

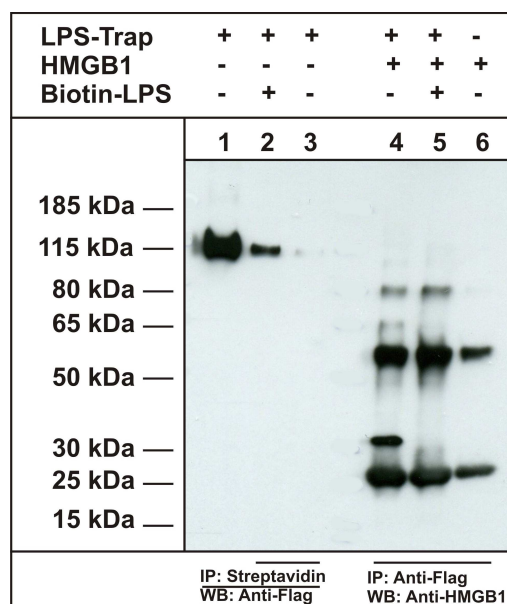


Um die Interaktion adenoviraler Partikel mit dem Fusionsprotein zu prüfen, wurden Ad- $\beta$ -Gal-haltige QBI293A-Überstände mit gereinigter LPS-Trap-His inkubiert und anschließend das Protein mit Anti-Flag Agarose gefällt. Als Kontrolle wurde die Immunpräzipitation parallel in den entsprechenden Überständen ohne LPS-Trap-His durchgeführt. Nach der Auftrennung der Präzipitate erfolgte die Detektion gebundener Viren durch einen gegen adenovirale Oberflächenproteine gerichteten Antikörper im Western Blot. Das Bandenmuster der Präzipitate LPS-Trap-His inkubierter Überstände zeigte aber keine Unterschiede zu den Kontrollen (Abb. 4.19). Eine Bindung der LPS-Trap an adenovirale Oberflächenproteine konnte somit nicht nachgewiesen werden.

#### 4.2.3 Interaktion der LPS-Trap mit High-mobility group box 1 protein

Die Funktion des *High-mobility group box 1 protein* (HMGB1) wurde ursprünglich auf die Rolle als transkriptionsregulierender Faktor begrenzt. Inzwischen ist aber bekannt, dass das Protein darüber hinaus Zytokin-ähnliche Eigenschaften besitzt. So wurde HMGB1 als Spätmediator von entzündlichen Reaktionen identifiziert [133] und spielt daher eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis und chronischer Krankheiten [134]. Neben dem *receptor for advanced glycation end-products* (RAGE) werden auch TLR4 und TLR2 als verantwortliche Rezeptoren für die Signaltransduktion diskutiert [135; 136]. In Koimmunpräzipitationsexperimenten sollte nun herausgefunden werden, ob HMGB1 an die LPS-Trap bindet.

Gereinigte LPS-Trap-His (1  $\mu$ g/ml) wurde 1 h zusammen mit rekombinantem HMGB1 (1  $\mu$ g/ml) in PBS plus FCS 10% inkubiert. Nach der Fällung der LPS-Trap-His über Anti-Flag Agarose wurde das Präzipitat durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Bande von HMGB1 mit etwas über 30 kDa konnte im Anti-HMGB1 Western Blot identifiziert werden (Abb. 4.20, Spur 4). Die Interaktion mit der LPS-Trap-His ließ sich durch eine Koinkubation mit LPS (1  $\mu$ g/ml) vollständig aufheben (Abb. 4.20, Spur 5). Da die Verdrängung von HMGB1 durch einen vergleichsweise geringen molaren Überschuss an LPS (2:1) gelang, ist davon auszugehen, dass die Affinität der LPS-Trap zu LPS deutlich größer als zu HMGB1 ist. Die gleichermaßen in der Negativkontrolle (Abb. 4.20, Spur 6) zu erkennenden Banden bei 55 kDa und 25 kDa rührten von der schweren und leichten Kette des Anti-Flag-M2 Antikörpers her.



**Abb. 4.20: HMGB1 bindet LPS-Trap-His**

1 µg/ml LPS-Trap-His wurde mit den angegebenen Kombinationen von Biotin-LPS und HMGB1 in PBS/FCS 10% inkubiert. Die Fällung erfolgte entweder mit Streptavidin Sepharose (Spur 2, 3) oder Anti-Flag Agarose (Spur 4-6). Die Präzipitate wurden im Anti-Flag (Spur 1-3) oder Anti-HMGB1 Western Blot analysiert. In Spur 1 wurde die LPS-Trap-His als Positivkontrolle direkt auf das SDS-Gel aufgetragen.

#### 4.2.4 Untersuchungen über Bindung von Fettsäuren an TLR4/MD-2

Die Verbindung zwischen Entzündung und Diabetes gilt inzwischen als unumstritten. So wird Adipositas als ein Zustand chronischer, geringgradiger Entzündung betrachtet [137; 138]. Die Art und Weise der Zusammenhänge ist noch nicht vollständig geklärt, TLR4 scheint aber eine Schlüsselrolle zu spielen [139].

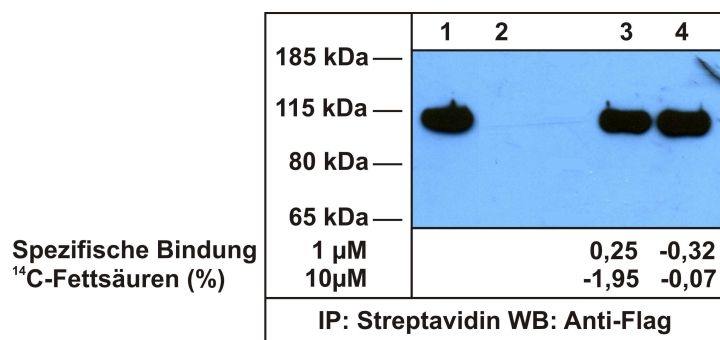
##### 4.2.4.1 Keine direkte Assoziation von <sup>14</sup>C-Öl- und Stearinsäure an der LPS-Trap-His

Stearin- und Ölsäure beeinflussen die Resistin- und MCP-1 Sekretion in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten. Diese Effekte sind über den TLR4 Signalweg vermittelt [140]. Ob eine direkte Bindung der Fettsäuren an TLR4/MD-2 für diese Effekte verantwortlich ist, sollte über Fettsäure-Bindungsassays geklärt werden.

Die LPS-Trap-His wurde mit Anti-Flag Agarose aus S2-Überständen gefällt und mit <sup>14</sup>C-markierter Öl- bzw. Stearinsäure 2 h in PBS/FCS 20% inkubiert. Für die Verdrängungsreaktion wurde die Hälfte der Proben mit einem 100-fachen molaren Überschuss der entsprechenden kalten Fettsäure versetzt. Über Szintillationsmessungen konnte anschließend die Menge gebundener Fettsäure

bestimmt werden. Weder Stearin- noch Ölsäure zeigten in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  eine spezifische Bindung an die LPS-Trap-His (Abb. 4.21, unten).

Parallel wurde ein Fettsäure-LPS-Verdrängungs-Assay durchgeführt. Überstände von LPS-Trap-His S2-Transfektanden wurden mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Biotin-LPS in Gegenwart eines 100-fachen molaren Überschusses der angegebenen Fettsäuren in PBS plus FCS 20% 1 h inkubiert. Nach der Fällung mit Streptavidin Sepharose wurden die Präzipitate über ein SDS-Gel aufgetrennt und im Anti-Flag Western Blot analysiert. Auch hier waren sowohl Stearin- (Spur 3) als auch Ölsäure (Spur 4) nicht in der Lage, das biotinylierte LPS aus seiner Bindung zu verdrängen, da die LPS-Trap-His weiterhin durch das biotinylierte LPS koimmunpräzipitiert wurde (Abb. 4.21).



**Abb. 4.21: Fettsäure-Verdrängungs-Assays mit der LPS-Trap-His**

Western Blot: LPS-Trap-His-haltige S2-Überstände wurden mit biotinyliertem LPS alleine (Spur 1) oder in Gegenwart eines 100-fachen molaren Überschusses an Stearin- (Spur 3) bzw. Ölsäure (Spur 4) inkubiert. Die LPS/Fusionsprotein-Komplexe wurden über Streptavidin immunpräzipitiert und die Präzipitate im Anti-Flag Western Bot analysiert. Präzipitate aus unbehandelten Überständen dienten als Negativkontrolle (Spur 2)

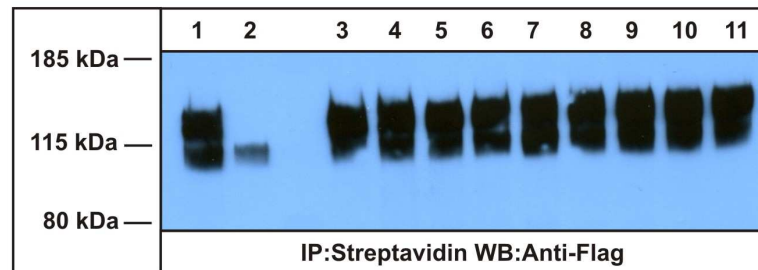
<sup>14</sup>C-Fettsäure-Bindungs-Assay: Anti-Flag Agarose Präzipitate der LPS-Trap-His wurden mit <sup>14</sup>C-markierter Stearin- (Spur 3, unten) bzw. Ölsäure (Spur 4, unten) alleine oder in Gegenwart eines 100-fachen molaren Überschusses an kalter Fettsäure in PBS plus FCS 20% inkubiert. Die Menge an gebundener Fettsäure wurde im Szintillationsmessgerät bestimmt. Als spezifische Bindung wurde definiert: (gebundene <sup>14</sup>C (cpm) – gebundene <sup>14</sup>C mit Überschuss kalter Fettsäure (cpm)) x 100 % / total eingesetzte <sup>14</sup>C (cpm).

#### 4.2.4.2 Untersuchungen mit weiteren Fettsäuren

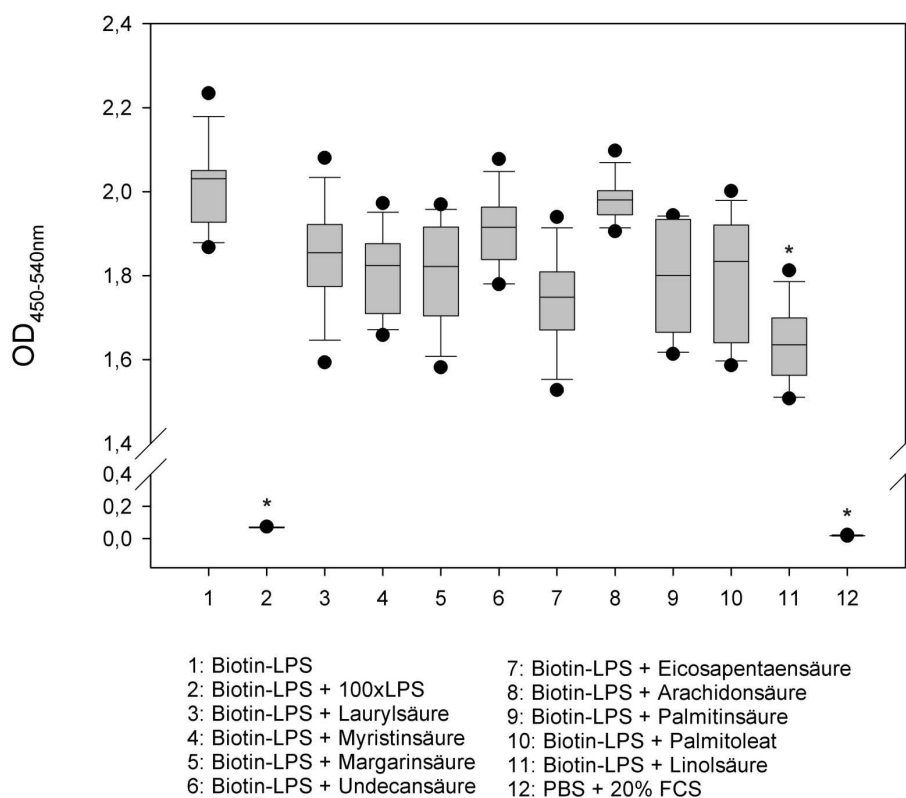
Neben der Stearin- und Ölsäure sollten noch weitere Fettsäuren auf die direkte Interaktion mit TLR4/MD-2 überprüft werden. Da die Verwendung von radioaktiven Fettsäuren zwar sensitiver wäre, aber hohen Aufwand und Kosten verursacht hätte, sollte bei diesen Experimenten die Verdrängung von LPS durch die Fettsäuren untersucht werden. Die Verdrängungsexperimente wurden analog zu 4.2.4.1 durchgeführt. Auch hier zeigte sich bei keiner der untersuchten Fettsäuren

eine erkennbare Verdrängung des Biotin-LPS aus seiner Bindungstasche (Abb. 4.22 A).

**A**



**B**



**Abb. 4.22: Bindungsassay der LPS-Trap-His mit Fettsäuren**

(A) Überstände LPS-Trap-His produzierender QBI293A-Zellen wurden mit Biotin-LPS alleine (Spur 1) oder in Gegenwart eines 100-fachen molaren Überschusses an unmarkiertem LPS (Spur 2) bzw. eines 1000-fachen molaren Überschusses der angegebenen Fettsäuren (Spur 3-11) inkubiert. Das LPS wurde durch Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert, die Präzipitate durch SDS-PAGE aufgetrennt und gebundene LPS-Trap-His im Anti-Flag Western Blot detektiert.

(B) LPS-Trap-His wurde in Anti-Flag Antikörper beschichteten Platten fixiert und mit Biotin-LPS alleine (Nr.1) oder in Gegenwart eines 100-fachen molaren Überschusses an unmarkiertem LPS (Nr.2) bzw. eines 1000-fachen molaren Überschusses an den angegebenen Fettsäuren (Nr.3-11) inkubiert. Gebundenes LPS wurde über Streptavidin-HRP detektiert und nach chromogener Reaktion im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450-540 nm quantifiziert.\*  $p < 0,05$  im Vergleich zu Nr.1, Varianzanalyse: Kruskal-Wallis-Test, Post-Hoc Analyse: Tukey-Test,  $n=8$

Für eine genauere Quantifizierung der Bindung wurde der LPS-Bindungs-ELISA herangezogen und zu einem Kompetitions-ELISA modifiziert. LPS-Trap-His wurde über einen Anti-Flag Antikörper auf eine ELISA-Platte fixiert und mit Biotin-LPS in Anwesenheit eines Überschusses an den genannten Fettsäuren inkubiert. Die Detektion des gebundenen LPS erfolgte daraufhin über HRP-gekoppeltes Streptavidin. In Gegenwart der Fettsäuren zeigte das LPS-Biotin bei allen untersuchten Proben eine tendenziell schwächere Bindung an die LPS-Trap-His. Mit Ausnahme der Linolsäure erreichten diese Unterschiede aber keine statistische Signifikanz (Abb. 4.22, B Nr.11). Eine vollständige Verdrängung des biotinylierten LPS war aber nur durch einen 100-fachen Überschuss an unmarkierten LPS möglich (Abb. 4.22 B, Nr. 2). Letztlich zeigte keine der untersuchten Fettsäuren eine annähernd hohe Avidität zu TLR4/MD-2 wie LPS.

### 4.3 LPS-Trap-Fc als Opsonin

Durch die Anlagerung spezieller Proteine, den sogenannten Opsoninen, an die Oberfläche von Pathogenen können diese durch das Immunsystem erkannt und Maßnahmen zu deren Beseitigung eingeleitet werden. Dieser Vorgang wird als Opsonisierung bezeichnet. Typische Beispiele für Opsonine sind Antikörper, Komplementfaktoren oder das C-reaktive Protein. Antikörper erfüllen als bifunktionelle Moleküle eine Art Brückenfunktion zwischen Pathogen und Phagozyt: während z.B. der variable Teil eines Antikörpers an das Antigen bindet, interagiert die Fc-Region mit Fc-Rezeptoren auf Makrophagen oder Neutrophilen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt eine wesentlich effektivere Phagozytose und Eliminierung. Ferner führt die Anlagerung eines Antikörpers an Oberflächen zur Aktivierung des Komplementsystems und von NK-Zellen. Diese Prozesse werden als *complement dependent cytotoxicity* (CDC) bzw. *antigen dependent cell cytotoxicity* (ADCC) bezeichnet.

Durch die Dimerisierung über ein humanes IgG1-Fc Fragment besitzt die LPS-Trap-Fc theoretisch die Fähigkeit als Adapter zwischen Pathogen und Phagozyt im Sinne eines Antikörpers zu wirken. Im Folgenden soll daher die Fähigkeit der LPS-Trap-Fc, Gram-negative Bakterien zu opsonisieren, beschrieben werden.

### 4.3.1 Klonierung der LPS-Trap-IgG-Varianten

Humanes IgG wird abhängig von der natürlichen Konzentration im humanen Serum in vier Isotypen (IgG1-4) eingeteilt [141]. Diese Subklassen sind zu 95% in ihrer Aminosäuresequenz identisch und unterscheiden sich hauptsächlich in der Gelenkregion des Fc-Fragments [142]. Dies führt zu unterschiedlich starken biologischen Aktivitäten. So nimmt die Opsonisierungs-Aktivität in Abhängigkeit von der Affinität zu den Fcγ-Rezeptoren in folgender Reihenfolge ab: IgG1>IgG3>>IgG4>IgG2. Die Aktivität der CDC verhält sich ähnlich: IgG3>IgG1>>IgG2>>IgG4 [143]. Um den tatsächlichen Einfluss der LPS-Trap-Fc auf die Phagozytose und Komplementaktivierung möglichst exakt darzustellen, wurden zunächst Konstrukte der verschiedenen Isotypen von IgG kloniert.

#### 4.3.1.1 LPS-Trap-Fc1

Die Klonierung der LPS-Trap-Fc1 in pIRESneo3 wurde bereits im Abschnitt 4.1.1.3.1 dargestellt.

#### 4.3.1.2 LPS-Trap-Fc2

Die Fc-Region von humanem IgG2 wurde per PCR mit den IgG2 spezifischen Primern (9) und (10) amplifiziert und in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO subkloniert. Durch die Primer wurde sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende eine *AgeI*-Restriktionsenzymsternstelle eingeführt. Die IgG1-Fc-Sequenz wurde aus dem Vektor pMT/Hygro/LPS-Trap-Fc durch einen Restriktionsverdau mit *AgeI* herausgeschnitten und die Schnittstellen dephosphoryliert. Anschließend konnte das mit *AgeI* verdaute IgG2-Fc-Fragment aus pCR-Blunt II-TOPO in den Expressionsvektor kloniert werden.

Um die Expression in Säugerzellen zu ermöglichen, wurde die LPS-Trap-Fc2 Sequenz aus pMT/Hygro durch die Restriktionsenzyme *NotI* und *PmeI* herausgeschnitten und in den Expressionsvektor p3xFlag-CMV-8 kloniert.

Für die stabile Transfektion von Säugerzellen wurde die LPS-Trap-Fc2 zusätzlich in den Vektor pIRES/neo3 kloniert. Hierbei wurde analog zur Klonierung der LPS-Trap-Fc1 in pIRES/neo3 vorgegangen (siehe 4.1.1.3.1).



#### 4.3.1.3 LPS-Trap-Fc3 und -Fc4

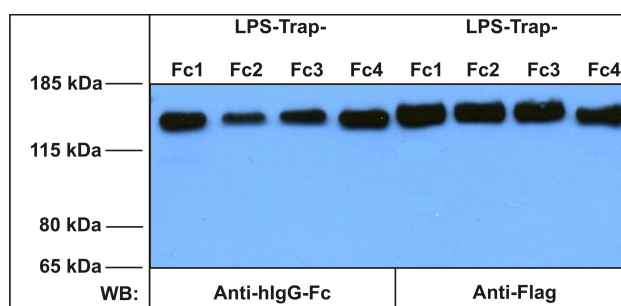
Für die Klonierung der LPS-Trap-Fc3 und -Fc4 wurde der TLR4/MD-2-Teil der LPS-Trap über eine PCR mit den Primern (5) und (6) aus dem Templat LPS-Trap-Fc in p3xFlag-CMV-8 amplifiziert und zusätzlich eine 5'- und 3'- *Bam*HI-Schnittstellensequenz eingefügt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit dem Enzym *Bam*HI, die Vektoren pFUSE-hlgG3-Fc2 bzw. pFUSE-hlgG4-Fc2 mit *Bgl*II verdaut und dephosphoryliert. Da *Bam*HI und *Bgl*II identische Überhänge aber unterschiedliche Erkennungssequenzen besitzen, konnte das PCR-Produkt unter Verlust der Schnittstellen in die Zielvektoren eingefügt werden.

Weil für die Versuche mit Säugerzellen ein einheitliches Protokoll angestrebt wurde, wurden die Fusionsproteine in den Vektor p3xFlag-CMV-8 umkloniert. Hierfür wurden pFUSE/LPS-Trap-Fc3 und -Fc4 mit *Nhe*I und p3xFlag-CMV-8 mit *Xba*I verdaut und anschließend die 5'-Überhänge mittels Klenow-Fragment durch die entsprechenden Nukleotide aufgefüllt. Der zweite Verdau erfolgte mit *Not*I. Die LPS-Trap-Fc3 bzw. -Fc4 konnte dadurch gerichtet in p3xFlag-CMV-8 kloniert werden.

Die Klonierung in den Vektor pIRES/neo3 erfolgte wiederum analog zu 4.1.1.3.1.

#### 4.3.2 Expression der LPS-Traps-Fc1-4

Für die Produktion der LPS-Traps-Fc1-4 wurde zunächst die Zelllinie HEK293T gewählt. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Konstrukten in p3xFlag-CMV-8 transient transfiziert und nach 60 h die Zellüberstände auf die Anwesenheit der Fusionsproteine untersucht.



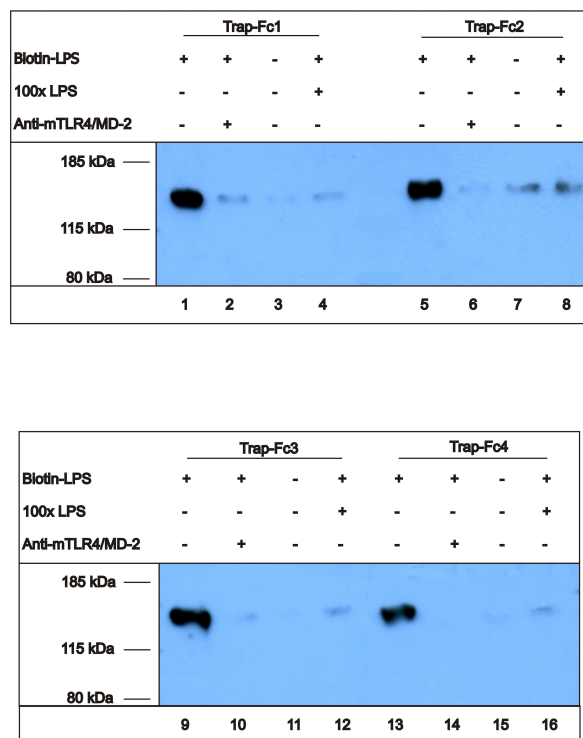
**Abb. 4.23: Expression der LPS-Trap in HEK293T-Zellen**

Überstände von transient mit der LPS-Trap-Fc1, -Fc2, -Fc3 oder -Fc4 transfizierten HEK293T-Zellen wurden unter reduzierenden Bedingungen durch eine SDS-PAGE analysiert. Die löslichen Proteine wurden im Anti-hlgG-Fc und im Anti-Flag Western Blot überprüft.

Nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel konnten sowohl im Anti-hIgG-Fc als auch im Anti-Flag Western Blot die Fusionsproteine bei ca. 140 kDa identifiziert werden (Abb. 4.23).

#### 4.3.3 Nachweis der LPS-Bindung an den LPS-Traps-Fc1-4

Um die Bindung von LPS an den jeweiligen neuen Fc-Konstrukten zu überprüfen, wurde ein „LPS-Pull-down“ Assay durchgeführt. Jeweils 2 ml Überstand wurden mit 0,5 µg/ml biotinyliertem LPS versetzt. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation des biotinylierten LPS durch Streptavidin Sepharose. Im Anti-Flag Western Blot konnten die Konstrukte bei ca. 140 kDa detektiert werden (Abb. 4.24, Spuren 1, 5, 9, 13). Die Kontrolle ohne biotinyliertes LPS zeigte diese Bande nicht (Abb. 4.24, Spuren 3, 7, 11, 14).



**Abb. 4.24: Nachweis der Bindung von LPS an die LPS-Traps-Fc1-4**

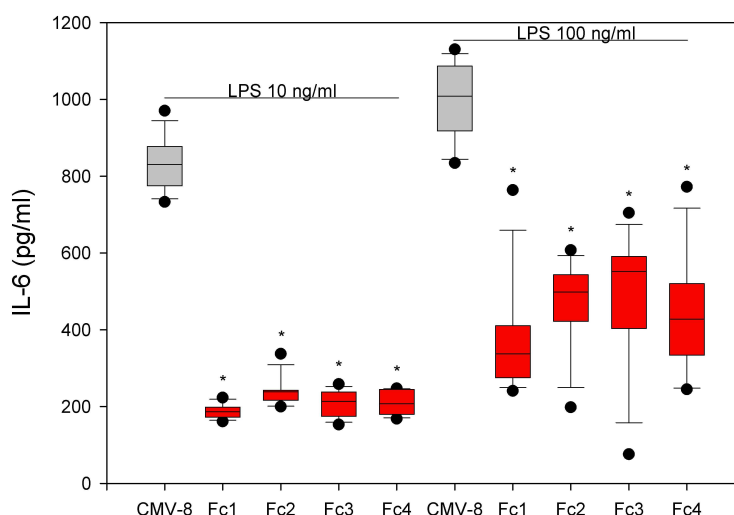
Überstände mit LPS-Trap-Fc1-4 Expressionsvektoren stabil transfizierter QBI293A-Zellen wurden mit biotinyliertem LPS inkubiert. Zusätzlich wurden einige Proben vor der Inkubation noch mit einem Überschuss an unmarkierten LPS bzw. einem monoklonaler Antikörper gegen den TLR4/MD-2 Komplex versetzt. Die Komplexe wurden mit Streptavidin Sepharose immunpräzipitiert und im Western Blot mit einem Anti-Flag-Antikörper detektiert.



Wurde der Überstand mit einem Anti-TLR4/MD-2 Antikörper vorbehandelt, konnte die Bindung von LPS an die LPS-Trap-Fc verhindert werden. (Abb. 4.24, Spuren 2, 6, 8, 10). Da der Antikörper spezifisch mit dem TLR4/MD-2 Komplex interagiert, erfolgte die Bindung des LPS durch die Fusionsproteine tatsächlich durch den gesamten TLR4/MD-2 Komplex. Wurden die Überstände vor dem „LPS-Pull-down“ mit 50 µg/ml unmarkiertem LPS versetzt, war ebenfalls keine LPS-Trap nachweisbar (Abb. 4.24, Spuren 4, 8, 12, 16). Diese Verdrängungsreaktionen belegten, dass das biotinylierte LPS tatsächlich an die LPS-Bindungstasche aller LPS-Trap-Fc-Varianten bindet.

#### 4.3.4 Überprüfung der biologischen Aktivität der LPS-Traps-Fc1-4

Im nächsten Schritt sollten die neutralisierenden Eigenschaften der LPS-Traps-Fc1-4 *in vitro* getestet werden. Hierfür wurde wiederum auf das Transwell-Modell zurückgegriffen, um die Fusionsproteine in einer möglichst nativen Form einzusetzen (siehe 4.1.2.3).



**Abb. 4.25: LPS-Traps-Fc1-4 hemmen die LPS induzierte IL-6 Produktion *in vitro***

HEK293T-Zellen, transfiziert mit LPS-Trap-Fc1-4 oder Kontrollvektor (CMV-8), wurden in 24-well Platten ausgesät und mit in Transwells befindlichen MM6 Zellen kokultiviert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 10 ng/ml (links) bzw. 100ng/ml (rechts) LPS über Nacht stimuliert. Die IL-6-Konzentration im Überstand wurde anschließend per ELISA vermessen. \*  $p < 0,001$  (Mann-Whitney-U-Test),  $n=8$

HEK293T-Zellen wurden mit den jeweiligen Konstrukten in p3XFlag-CMV-8 Expressionsvektoren transfiziert und 8 h später in 24-well Platten ausgesät. Mit

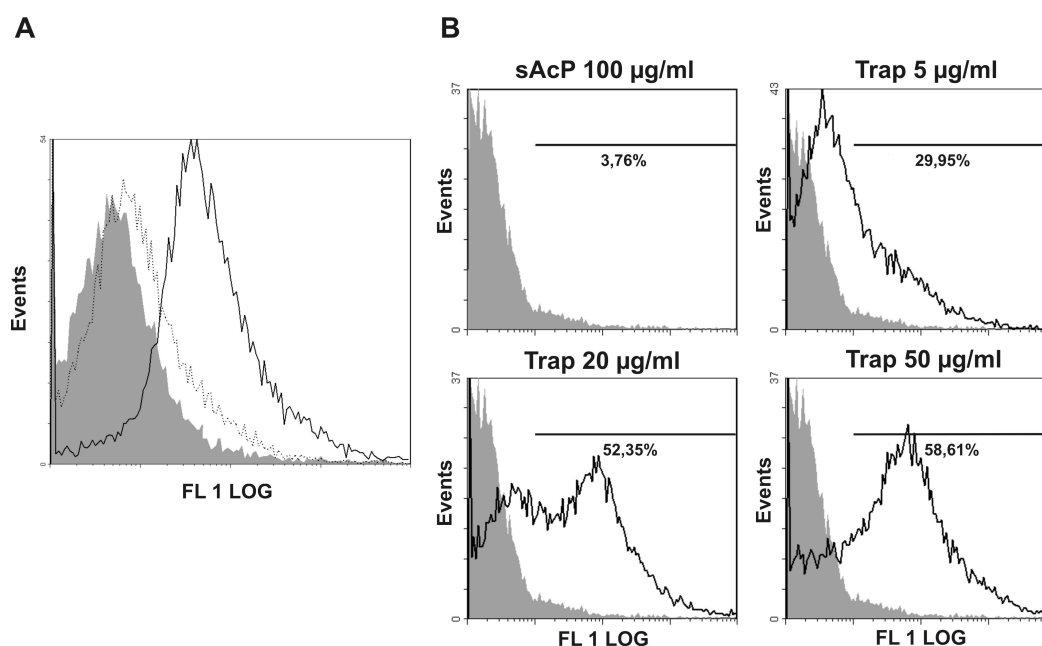
MM6-Zellen beladene Transwells wurden eingesetzt und die beiden Zelllinien 48 h kokultiviert. Daraufhin erfolgte die Stimulierung mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml LPS über Nacht und die Messung der IL-6-Konzentration im Überstand mittels ELISA. LPS-stimulierte MM6, die mit LPS-Trap-Fc transfizierten HEK293T kokultiviert wurden, zeigten eine signifikant geringere IL-6 Sekretion verglichen mit jenen, die mit kontrolltransfizierten HEK293T kokultiviert wurden (Abb. 4.25). Alle Varianten der LPS-Trap-Fc hemmten somit eine durch LPS hervorgerufene proinflammatorische Reaktion *in vitro*.

### 4.3.5 Bindung der LPS-Trap an Bakterien

Nachdem die Eigenschaften der neu konstruierten LPS-Traps-Fc1-4 in Bezug auf LPS-Bindungsfähigkeit und biologische Aktivität überprüft worden waren, sollte in weiteren Schritten festgestellt werden, ob die Fusionsproteine an Gram-negative Bakterien binden.

#### 4.3.5.1 Assoziation der LPS-Trap-His an *E. coli*

Für die Bindungsstudien der LPS-Trap wurde zunächst die LPS-Trap-His verwendet, da diese auch in gereinigter, konzentrierter Form aktiv ist. Hierfür wurde das Fusionsprotein in einer Konzentration von 25 µg/ml mit  $5 \times 10^6$  CFU/ml *E. coli* K12 1 h bei RT inkubiert. Als Kontrolle fungierte das 6xHis- und Flag-Peptid markierte lösliche IL-1 Rezeptor akzessorische Protein (*soluble IL-1 receptor accessory protein*, Flag-sAcP) in einer Konzentration von 100 µg/ml. Dem Bindepuffer wurde noch 10% FCS zugesetzt, um einerseits eine unspezifische Bindung zu verhindern, andererseits durch enthaltene Lipotransferasen eine mögliche Bindung der LPS-Trap an LPS zu vermitteln. Nach der Färbung der Bakterien mit einem Anti-Flag-FITC-Antikörper konnte in durchflusszytometrischen Messungen eine robuste Bindung der LPS-Trap an Bakterien festgestellt werden (Abb. 4.26, A). Wurde die LPS-Trap-His zuvor mit einem Überschuss an LPS (100 µg/ml) geblockt, war nur noch eine schwache Erhöhung der Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle messbar (Abb. 4.26, A). Die Bindung an Bakterien erfolgte also über die LPS-Bindungstasche. Die Inkubation der Bakterien mit steigenden Konzentrationen (5 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml) an LPS-Trap führte zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Fluoreszenz (Abb. 4.26, B). Folglich besitzt die LPS-Trap zumindest in relativ hohen Konzentrationen die Fähigkeit, an die Oberfläche Gram-negativer Bakterien zu binden.



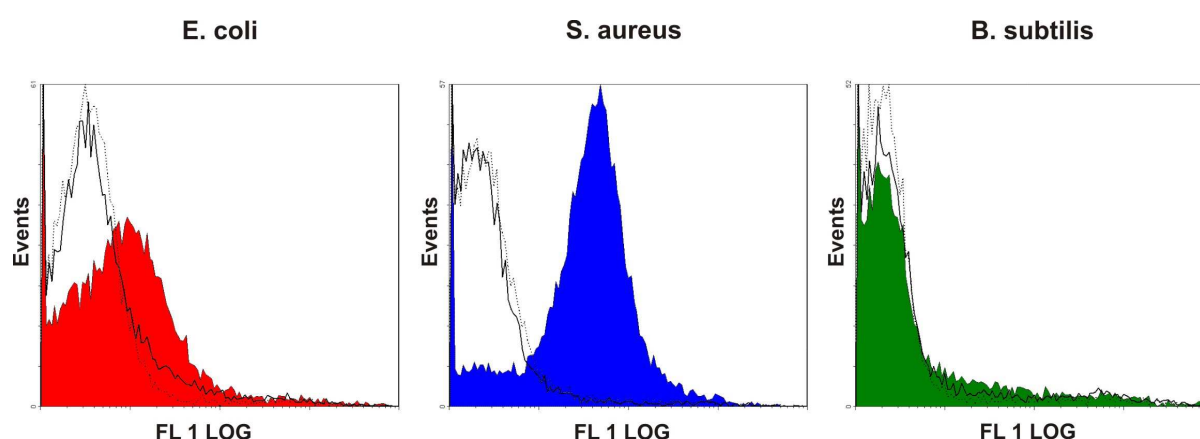
**Abb. 4.26: LPS-Trap bindet an *Escherichia coli***

*E. coli* K12 Bakterien ( $5 \times 10^6$  CFU/ml) wurden 1 h mit 25 µg/ml (A) oder mit 5 µg/ml, 20 µg/ml oder 50 µg/ml LPS-Trap-His (B) (durchgezogene Linie) oder 100 µg/ml sAcP (grau gefüllt) in PBS plus FCS 10% bei RT inkubiert. In (A) wurde die LPS-Trap noch zusätzlich mit 100 µg/ml LPS (gepunktete Linie) vorbehandelt. Die LPS-Trap-Bindung wurde mit Hilfe eines Anti-Flag-FITC-Antikörpers detektiert. Die Quantifizierung der Bindung erfolgte mittels Durchflusszytometrie im Fluoreszenzkanal 1 (FL1, grün).

#### 4.3.5.2 Spezifische Bindung der LPS-Trap-Fc an Gram-negative Bakterien

In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob neben der LPS-Trap-His auch ihre IgG-Fc-Chimären an die Bakterienoberfläche binden. Hierfür konnten auf Grund des Aktivitätsverlustes der LPS-Trap-Fc nach der Reinigung (siehe 4.1.2.2) ausschließlich Zellüberstände verwendet werden.

Für die Überprüfung der Bindung wurde 1 ml LPS-Trap-Fc1-haltige Überstände von stabil transfizierten QBI293A mit  $5 \times 10^6$  CFU hitzeinaktivierten *E. coli* K12 oder den Gram-positiven Stämmen *S. aureus* (ATCC 6538) bzw. *B. subtilis* (ATCC 6638) 1 h bei RT inkubiert. Als Negativ-Kontrollen wurde FCS-haltiges Medium (DMEM) entweder alleine oder zusätzlich mit 100 µg/ml Flag-sAcP verwendet. Nach der Färbung mit einem Anti-Flag-FITC mAb wurden die Ansätze wiederum mittels Durchflusszytometrie vermessen. Analog zur LPS-Trap-His ließ sich eine Bindung an der Oberfläche von *E. coli* nachweisen (Abb. 4.27, linkes Histogramm). Die vergleichsweise geringe Zunahme der Fluoreszenzaktivität gegenüber 4.3.5.1 ist mit den deutlich geringeren Konzentrationen der LPS-Trap-Fc in Zellüberständen zu erklären.



**Abb. 4.27: LPS-Trap-Fc1 bindet an *Escherchia coli* und *Staphylococcus aureus***

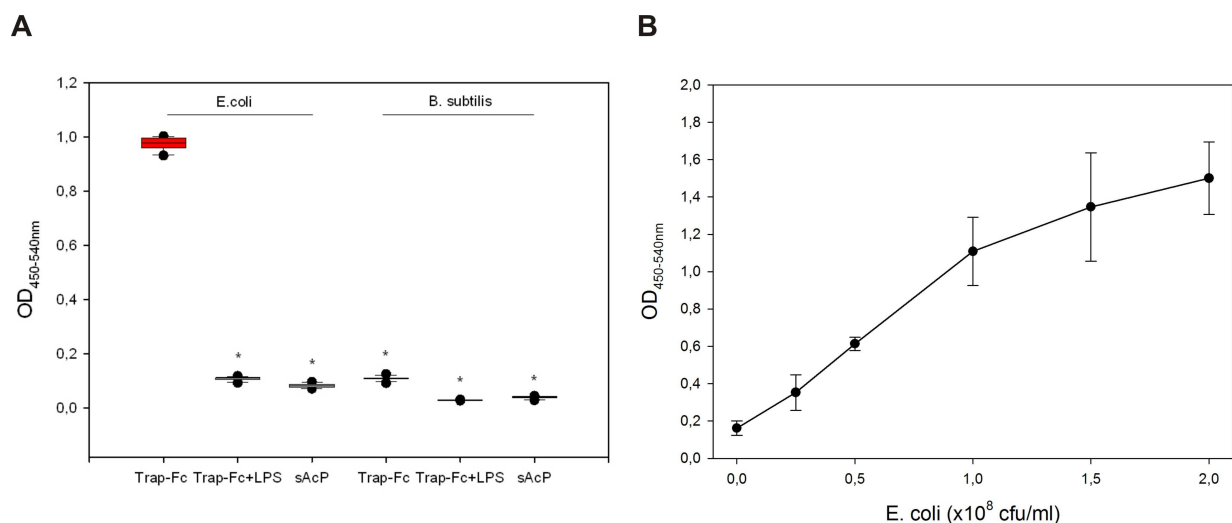
$5 \times 10^6$  CFU/ml an *E. coli* (rot), *S. aureus* (blau) oder *B. subtilis* (grün) wurden 1 h bei RT mit LPS-Trap-Fc1-haltigen Überständen inkubiert. Als Kontrollen dienten DMEM plus 10% FCS (gepunktete Linie) bzw. DMEM plus 10% FCS plus 100 µg/ml Flag-sAcP (durchgezogene Linie). Die Detektion erfolgte durchflusszytometrisch nach Färbung mit einem Anti-Flag-FITC-Antikörper im Fluoreszenzkanal 1 (FL1, grün)

Die beste Bindung der LPS-Trap-Fc zeigte sich an den Gram-positiven Stamm *S. aureus*, dessen Zellwand kein LPS enthält (Abb. 4.27, mittleres Histogramm). Dieses zunächst überraschende Ergebnis lässt sich mit dem auf der Zelloberfläche von *S. aureus* befindlichen Protein A erklären. Dieses Protein verhilft *S. aureus*, der Opsonisierung durch Antikörper zu entkommen, indem es Wirtsantikörper an deren Fc-Domäne bindet und für die Fc-Rezeptoren der Phagozyten maskiert. Die Bindung an *S. aureus* kann daher als Positiv-Kontrolle für eine Oberflächenassoziation mit relativ hoher Affinität betrachtet werden. In den Ansätzen mit *B. subtilis* zeigte sich hingegen keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität (Abb. 4.27, rechtes Histogramm). Die Bindung der LPS-Trap-Fc ist folglich spezifisch für Gram-positive Bakterien.

Die Assoziation der LPS-Trap-Fc mit der bakteriellen Oberfläche sollte noch in einem weiteren System überprüft werden. Hierfür wurde ein „bakterieller ELISA“ etabliert. Lebendige Bakterien wurden über Nacht bei Raumtemperatur in eine hochbindende ELISA-Platte ( $5 \times 10^7$  CFU/well) ausplattiert und fungierten somit als „Fang-Antikörper“ für die eingesetzten LPS-Trap-Fc1-haltigen Zellüberstände. Ein Teil dieser Überstände wurde über Nacht bei 4°C mit 10 µg/ml LPS versetzt, um die LPS-spezifische Bindung an der Bakterienoberfläche zu bestätigen. Als Kontrolle für die Bakterienspezifität dienten *B. subtilis* bzw. für die Proteinspezifität mit Flag-sAcP

(10 µg/ml) versetztes Medium (DMEM 10%). Für die Detektion der LPS-Trap-Fc1 wurde ein Anti-Flag-HRP-gekoppelter Antikörper verwendet. Hier zeigte sich deutlicher als bei den durchflusszytometrischen Messungen, dass die LPS-Trap-Fc1 spezifisch an die Oberfläche Gram-negativer Bakterien bindet und sich diese Bindung durch Vorinkubation mit LPS fast vollständig verhindern lässt (Abb. 4.28, A).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden ELISA-Platten mit steigenden Konzentrationen an *E. coli* beschichtet. Durch die Titration der Bakterien konnte dargestellt werden, dass die Menge an gebundener LPS-Trap-Fc1 allein von der Anzahl der adsorbierten Bakterien abhängt (Abb. 4.28, B). Flag-sAcP zeigte bei einer Bakterienkonzentration von  $2 \times 10^8$  CFU/ml keine Bindung (Daten nicht gezeigt). Die Assoziation der LPS-Trap mit bakteriellen Oberflächen beruht somit ausschließlich auf der äußeren Struktur der Gram-negativen Zellwand bzw. auf der Anwesenheit von LPS, während unspezifische Bindung der Fusionsproteine an Gram-positive Bakterien oder an die hochbindende Oberfläche der ELISA-Platten ausgeschlossen werden konnte.



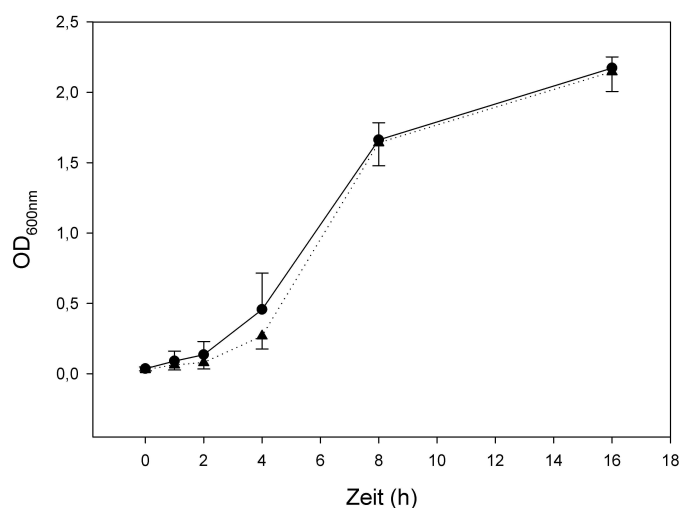
**Abb. 4.28: LPS-Trap-Fc1 bindet spezifisch und dosisabhängig an Gram-negative Bakterien**

(A) Lebendige *E. coli* bzw. *B. subtilis* wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^8$  CFU/ml auf ELISA-Platten präpariert. Die beschichteten Platten wurden 2 h mit LPS-Trap-Fc1 (Trap-Fc), mit LPS (10 µg/ml) vorgeblockter LPS-Trap-Fc1 (Trap-Fc+LPS) oder mit Flag-sAcP-haltigen (Kontrolle) Zellüberständen inkubiert. An adsorbierte Bakterien gebundene LPS-Trap-Fc1 wurde mittels ELISA über einen Anti-Flag-HRP-Antikörper detektiert. \*  $p < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test,  $n=8$

(B) Eine ELISA Platte wurde mit lebendigen *E. coli* in 2-fach Verdünnungen beschichtet und mit LPS-Trap-Fc1-haltigen Überständen inkubiert. Die Menge gebundener LPS-Trap-Fc1 wurde mittels ELISA über einen Anti-Flag-HRP-Antikörper bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte plus bzw. minus SD von Quadruplikaten einer Extinktionsmessung bei den Wellenlängen 450-540 nm

#### 4.3.5.3 Die LPS-Trap-Fc besitzt keinen bakteriziden Effekt auf Gram-negative Bakterien

Über den Mechanismus der Bindung der LPS-Trap-Fc an die Zellwand Gram-negativer Bakterien konnten mit den vorhandenen Mitteln nur Vermutungen angestellt werden. Es stellte sich die Frage, ob durch das Fusionsprotein die Membranintegrität beschädigt oder zerstört wird. Das polykationische, amphiphile Antibiotikum Polymyxin B besitzt durch seine Interaktion mit sauren Phospholipiden der äußeren Membran eine bakterizide Wirkung auf viele Gram-negative Stämme [144]. Um einen potentiellen direkten bakteriziden Effekt auf Gram-negative Bakterien zu überprüfen, wurden *E. coli* K12 in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^7$  CFU/ml 1 h bei 37°C mit LPS-Trap-Fc1 oder T2/6-Fc-haltigen konzentrierten Zellüberständen inkubiert und die Bakterien anschließend abzentrifugiert. Das Pellet wurde in LB-Medium aufgenommen und das Wachstum anhand der Trübung des Mediums zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Hierbei konnte kein Unterschied in der Wachstumsrate der LPS-Trap-Fc1 behandelten Bakterien gegenüber den Kontrollen festgestellt werden (Abb. 4.29). Das Fusionsprotein besitzt demnach keinen direkten bakteriziden Eigenschaften gegen Gram-negative Bakterien.



**Abb. 4.29: LPS-Trap-Fc besitzt keinen direkten Einfluss auf das Wachstum von *E. coli***

*E. coli* K12 wurden 1 h bei 37°C mit LPS-Trap-Fc1 (durchgezogene Linie) oder T2/6-Fc-haltigen (gepunktete Linie) Zellüberständen opsonisiert und anschließend in LB-Medium bei 37°C kultiviert. Das Bakterienwachstum wurde zu den angegebenen Zeitpunkten über die Extinktion des Kulturmediums bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von Quadruplikaten plus bzw. minus SD dar.

#### 4.3.6 Modulierung der Phagozytoseaktivität

Für die Phagozytoseaktivität Antigen-bedeckter Partikel zeigen sich in erster Linie die Fc-Rezeptoren von Makrophagen, Neutrophilen und Dendritischen Zellen verantwortlich. Fc-Rezeptoren binden zwar monomere Antikörper, die Signaltransduktion für Endozytose, Phagozytose und Abbau aufgenommener Partikel wird aber nur durch Rezeptorvernetzung ausgelöst [145]. Mit der nachgewiesenen Bindung der LPS-Trap-Fc an bakterielle Oberflächen ist die Grundvoraussetzung für eine mögliche Beeinflussung der Phagozytose erfüllt. Weitere Untersuchungen mit der LPS-Trap-Fc sollten nun aufzeigen, ob das Fusionsprotein tatsächlich opsonisierende Eigenschaften über sein IgG-Fc Fragment entwickelt.

##### 4.3.6.1 Einfluss der LPS-Trap-Fc1 auf die Phagozytoseaktivität

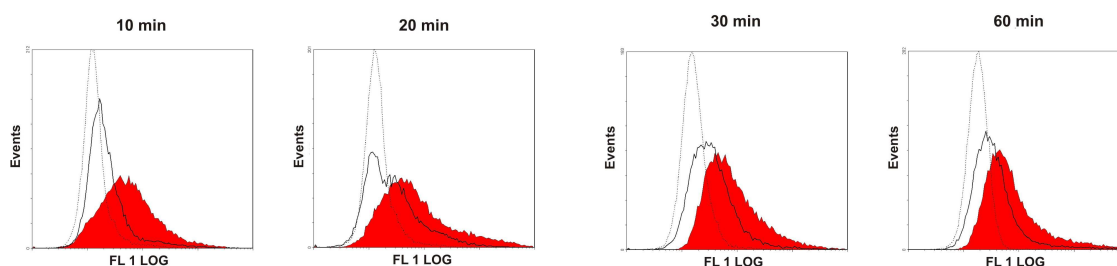
Zunächst sollte der Einfluss der LPS-Trap-Fc im zeitlichen Verlauf der Phagozytose untersucht werden. Als Phagozyten wurde die monozytische Zelllinie MM6 gewählt, um von Primärzellen unabhängig zu sein und besser reproduzierbare Ergebnisse zu erreichen. MM6 besitzen gegenüber anderen monozytischen Zelllinien den Vorteil, über viele Charakteristika von reifen Monozyten zu verfügen und sowohl Fcγ-RI als auch Fcγ-RII in zu Primärmonozyten vergleichbarer Konzentration auf der Oberfläche zu tragen [146; 147].

$5 \times 10^6$  fluoreszierende *E. coli* Partikel wurden 1 h bei 37°C mit LPS-Trap-Fc1-haltigen Überständen inkubiert. Als Kontrolle wurde Zellkulturmedium mit 10 µg/ml humanem IgG versetzt. Die Partikel wurden nach mehrmaligem Waschen mit  $5 \times 10^5$  MM6-Zellen in HBSS plus 0,5% HSA versetzt, so dass ein Verhältnis von Partikeln zu Phagozyt von 10 zu 1 vorlag. Die Ansätze wurden über die angegebenen Zeitspannen bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von  $\text{NaN}_3$  und Kühlung auf Eis gestoppt. Um die Menge der an der Zelloberfläche haftenden Bakterien zu erfassen, wurden mit  $\text{NaN}_3$  inaktivierte MM6 mit nicht opsonisierten Partikeln auf Eis inkubiert und jeweils als Negativkontrolle miterfasst. Die LPS-Trap-Fc1 vorbehandelten Partikel führten in einem Zeitrahmen von 60 min zu einer höheren Phagozytoserate als die mit hIgG inkubierten Bakterien (Abb. 4.30, A). Der Effekt der Fusionsproteine zeigte sich zwischen 10 und 20 min besonders deutlich. So erreichte die Phagozytose von LPS-Trap-Fc1 opsonisierten Partikeln nach 20 min bereits ihren Höhepunkt, während das Maximum für die Kontrollpartikel zumindest

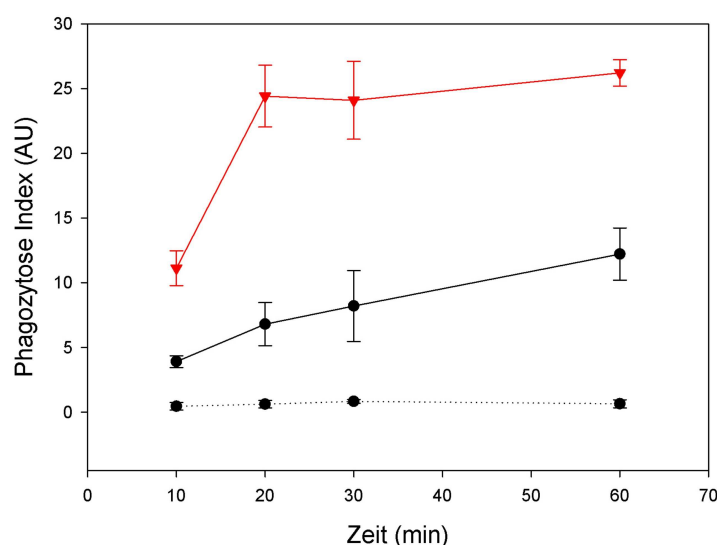


zwischen 30 und 60 min noch nicht feststellbar war. Der Phagozytose Index Fusionsprotein-opsonisierter Partikel war selbst nach 60 min demjenigen von Kontrollpartikeln deutlich überlegen (Abb. 4.30, B).

**A**



**B**



**Abb. 4.30: LPS-Trap-Fc1 erhöht die Phagozytoseaktivität von MM6-Zellen**

(A)  $5 \times 10^6$  fluoreszente *E. coli*-Partikel wurden mit LPS-Trap-Fc1-haltigen Überständen (rot gefüllt) oder mit 10  $\mu\text{g/ml}$  humanem IgG (durchgezogene Linie) 1 h bei 37°C opsonisiert. Anschließend wurden die gewaschenen Partikel für die angegebenen Zeitspannen mit  $5 \times 10^5$  MM6-Zellen in HBSS plus 0,5% HSA bei 37°C inkubiert und die Menge der phagozytierten Partikel mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Fluoreszenzkanal 1, FL1, grün). MM6, die mit nicht-opsonisierten Partikeln auf Eis inkubiert wurden, dienten als Negativ-Kontrolle (gepunktete Linie).

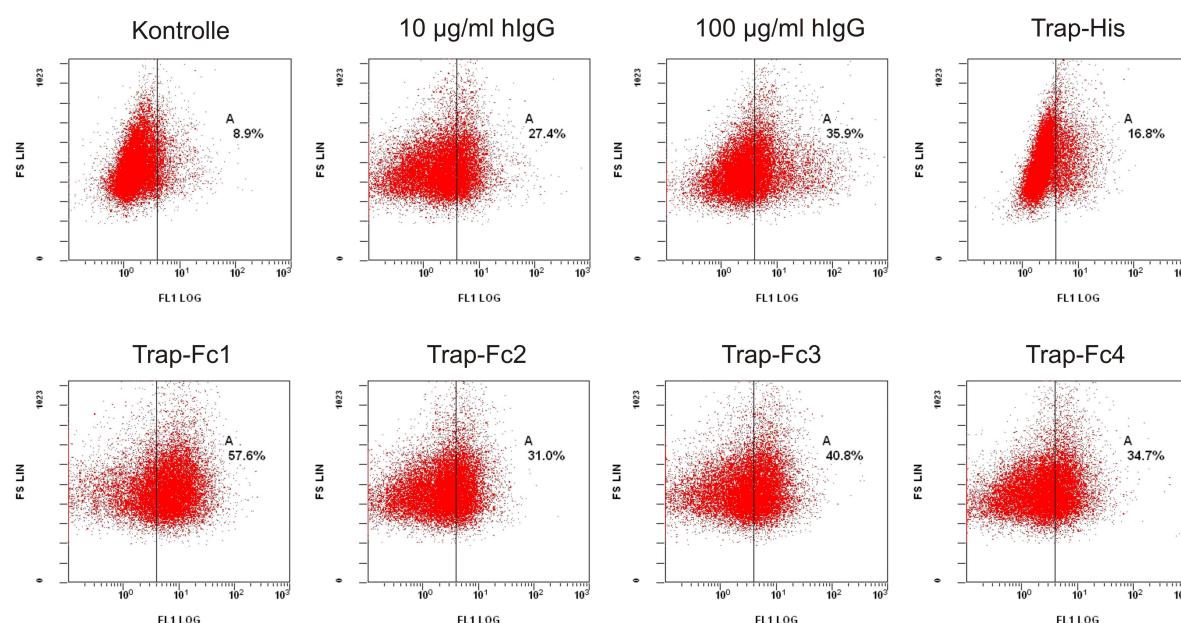
(B) Der zeitliche Verlauf der Phagozytose wurde in einem Phagozytose Index nach folgender Definition dargestellt: Geometrisches Mittel der Fluoreszenz der als positiv definierten Zellen  $\times$  Anzahl der positiven Zellen / 100. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte von Triplikaten plus/minus SD dar.

#### 4.3.6.2 Unterschiedliche Beeinflussung der Phagozytoseaktivität durch den IgG-Isotyp der LPS-Trap-Fc

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die LPS-Trap-Fc1 biologische Aktivität über ihre Fc-Region entwickelt, sollte in den folgenden Versuchen festgestellt



werden, ob für die Modulierung der Phagozytoseaktivität das IgG-Fc-Fragment oder andere Domänen des Fusionsproteins verantwortlich sind. Hierfür wurden LPS-Trap-Fc1, -Fc2, -Fc3, -Fc4 oder -His-haltige Zellüberstände mit fluoreszenten *E. coli*-Partikeln versetzt und die opsonisierten Partikel mit MM6-Zellen 10 min bei 37°C inkubiert (vgl. 4.3.6.1). Als Kontrolle wurden wiederum unbehandelte Partikel oder Medium, das mit humanem IgG versetzt wurde, verwendet. In dieser Versuchsreihe zeigte sich deutlich, dass die Phagozytoseaktivität der MM6 von den Isotypen der zur Opsonisierung verwendeten LPS-Trap-Varianten abhängt. Die Behandlung mit LPS-Trap-Fc1 Zellüberständen führte im Vergleich zu 10 bzw. 100 µg/ml humanen IgG zu einer ausgeprägten Erhöhung der Phagozytoseaktivität (Abb. 4.31). Bei der Behandlung mit LPS-Trap-Fc3 Zellüberständen fiel der Effekt auf die Phagozytose zwar schwächer aus, dieser war aber immer noch dem der hlgG opsonisierten Partikel überlegen (Abb. 4.31). LPS-Trap-Fc2 und -Fc4 behandelte Partikel konnten die Phagozytose nur schwach modulieren (Abb. 4.31).



**Abb. 4.31: Die Modulierung der Phagozytose durch die LPS-Trap-Fc ist IgG-Isotyp-abhängig**

*5x10<sup>6</sup> fluoreszente E. coli-Partikel wurden mit LPS-Traps-Fc1-4, LPS-Trap-His oder humanem IgG 1 h bei 37°C opsonisiert. Die gewaschenen Partikel wurden bei 37°C für 10 min mit 5x10<sup>5</sup> MM6-Zellen als Phagozyten inkubiert und das Ausmaß der phagozytierten Partikel per Durchflusszytometrie bestimmt (Fluoreszenzkanal 1, FL1, grün). MM6, die mit nicht-opsonisierten Partikeln auf Eis inkubiert wurden, dienten als Kontrolle*

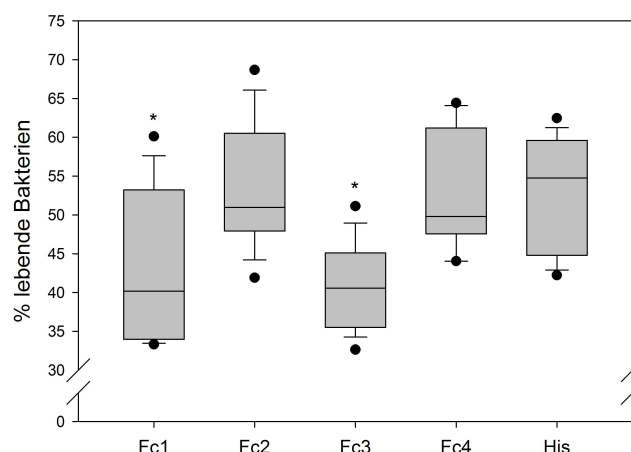
Diese Ergebnisse entsprachen den erwarteten Effekten, die sich aus den Bindungsaffinitäten der einzelnen IgG-Isotypen für Fc-Rezeptoren ableiten. Die LPS-

Trap-His zeigte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Phagozytose (Abb. 4.31). Daraus lässt sich das Fazit ziehen, dass die Fusionsproteine über ihre Fc-Region Bakterien opsonisieren und sich diese Effekte über den jeweiligen Isotyp kontrollieren lassen.

#### 4.3.7 Einfluss auf die Komplementaktivierung

Antikörper-bedeckte Pathogene führen im Laufe einer Immunreaktion nicht nur zur Erhöhung der Phagozytose durch die zelluläre Immunabwehr, sondern auch zu einer Aktivierung des angeborenen, humoralen Immunsystems, dessen wichtigster Baustein das Komplementsystem darstellt. Das Komplementsystem besteht aus mehreren verschiedenartigen Plasmaproteinen. Die Auslösung erfolgt kaskadenartig über drei unterschiedliche Aktivierungswege. Antigen-Antikörper Komplexe führen zur Aktivierung über den sogenannten klassischen Weg [148]. Ähnlich wie bei der Phagozytoseaktivierung über Fc-Rezeptoren ist hier die räumliche Nähe der Antikörper in einem Bereich zwischen 30 bis 40 nm für Auslösung der Komplementkaskade entscheidend [149]. Die Komplementkaskade mündet in der Formierung des Membranangriffskomplexes (*membrane attack complex, MAC*), der zur Porenbildung in der bakteriellen Zellwand und folglich zu deren Lyse führt. Die Komplementaktivität kann daher indirekt über die Abtötung von Bakterien gemessen werden.

Hierfür wurden mit einem GFP-Plasmid transformierte *E. coli* verwendet. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz nach Abtötung durch Lyse der Bakterien innerhalb einer Stunde erlischt. Die Bakterien wurden mit konzentrierten, eingestellten Zellüberständen der LPS-Traps-Fc1-4 oder –His 1h bei 37°C opsonisiert, gewaschen und mit humanem Komplementserum in HBSS plus 0,5% HSA 90 min lang bei 37°C inkubiert. Die Komplementreaktion wurde durch Kühlung auf Eis gestoppt und der Anteil der noch fluoreszierenden Bakterien im Durchflusszytometer bestimmt. Die Opsonisierung von *E. coli* mit LPS-Trap-Fc1 oder –Fc3 führte zu einer signifikant höheren Empfindlichkeit gegenüber humanem Komplement als die Opsonisierung mit LPS-Trap-Fc2, -Fc4 oder –His (Abb. 4.32).



**Abb. 4.32: Isotyp-abhängige Beeinflussung der Komplementaktivität durch LPS-Trap-Fc1-4**

GFP-exprimierende *E. coli* wurden mit konzentrierten LPS-Trap-Fc1-4 (Fc1-4) bzw. LPS-Trap-His (His)-haltigen Zellüberständen 1 h bei 37°C opsonisiert, gewaschen und anschließend 90 min bei 37°C mit 1 µl/ml humanem Komplementserum inkubiert. Die Komplementaktivität wurde über den Anteil an lebenden, noch fluoreszierenden Bakterien bestimmt mittels Durchflusszytometrie im Fluoreszenzkanal 1 (grün) bestimmt. Die Darstellung zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse von 6 Experimenten. \*  $p < 0,05$  gegenüber LPS-Trap-Fc2, -Fc4 und -His, Multipler Vergleich: Kruskal-Wallis-Test und Tukey Post-hoc-Test

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Fc1 und Fc3 Varianten der LPS-Trap spezifisch Gram-negative Bakterien opsonisieren und zu einer Erhöhung der komplementabhängigen Lyse führen. Neben der LPS-Bindung entfalten diese Fusionsproteine zumindest *in vitro* weitere biologische Aktivitäten durch Phagozytose- und Komplementaktivierung.

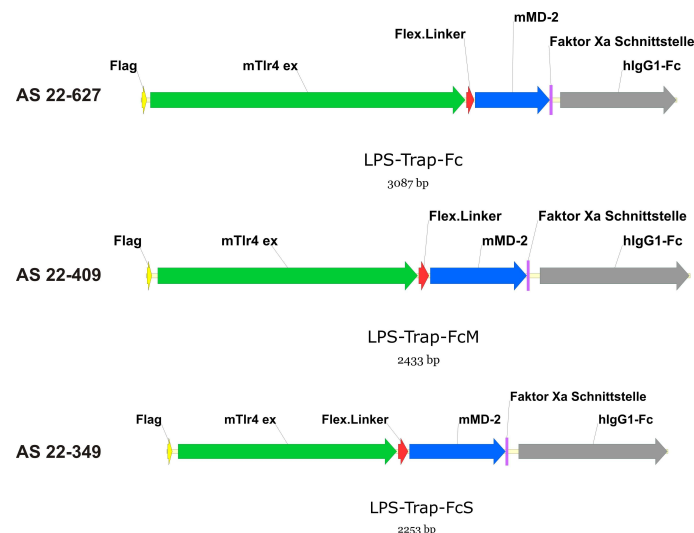
#### 4.4 Modifizierung der LPS-Trap-Fc

Der folgende Teil der Arbeit befasst sich mit Modifikationen an der LPS-Trap-Fc. Wie bereits in 4.1.1 aufgezeigt, sind die Ausbeuten der LPS-Trap-Fc relativ gering und für den Einsatz in Tierexperimenten nicht ausreichend. Durch die Reduktion des ungewöhnlich großen Fusionsproteins (260 kDa) auf seine pharmakologisch wichtigen Bestandteile könnten sowohl störende Oligomerisierungsphänomene beseitigt (vgl. 4.1.2.4.1) als auch höhere Produktionsausbeuten erreicht werden.

#### 4.4.1 Modifikation an der extrazellulären Domäne von TLR4

TLR4 und MD-2 kamen zunächst als Ansatzpunkte für Modifikation der LPS-Trap-Fc in Betracht. Durch Alanin-Scanning-Mutagenese konnte festgestellt werden, dass für die Formierung des TLR4/MD-2 Komplexes und die LPS-Sensitivität von TLR4/MD2 wichtige Aminosäuren über die gesamte Sequenz von MD-2 verteilt sind [150]. MD-2 schied daher als Mutationsziel aus. Auch die aminoterminal Region von Glu<sup>24</sup> bis Pro<sup>34</sup> in humanem TLR4 ist essentiell für die Interaktion mit MD-2 [35; 151]. Untersuchungen an humanen TLR4-Mutanten ergaben, dass die Region vom N-Terminus bis zu AS 320 unverzichtbar für die Assoziation mit MD-2 ist [35]. Mutanten mit Deletionen von AS 321 bis 637 waren aber noch in der Lage, MD-2 zu binden. Die Ansatzpunkte für Modifikationen der LPS-Trap-Fc beschränkten sich daher auf den C-Terminus von TLR4.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollten zwei LPS-Trap-Fc Mutanten generiert und ihre biologische Aktivität getestet werden. Die TLR4-Domäne der LPS-Trap-Fc wurde um 218 AS ( $\Delta$ 410-627, LPS-Trap-FcM) oder um 278 AS ( $\Delta$ 350-627, LPS-Trap-FcS) verkürzt (Abb. 4.33).



**Abb. 4.33: LPS-Trap-Fc im Vergleich mit LPS-Trap-FcM und -FcS**

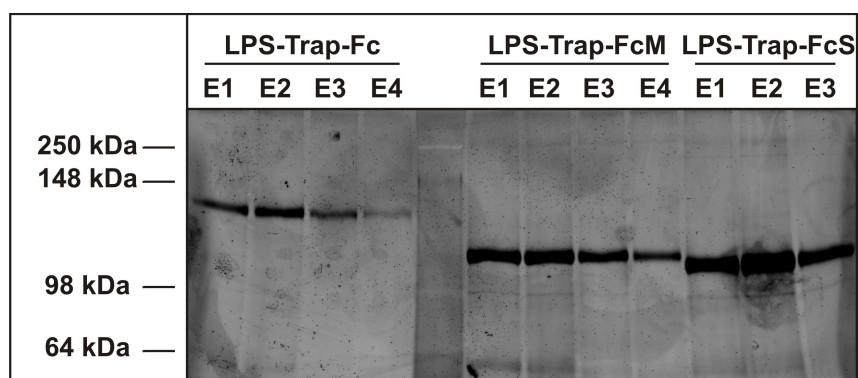
Die LPS-Trap-FcM und Fc-S wurden am C-terminalen Ende der extrazellulären Domäne von TLR4 um 218 bzw. 278 Aminosäuren gegenüber der LPS-Trap-Fc verkürzt.

##### 4.4.1.1 Klonierung und Expression der LPS-Trap-FcM und LPS-Trap-FcS

Die verkürzten TLR4-Mutanten wurden mit den Primern (7) und (21) (LPS-Trap-FcM) bzw. (7) und (20) (LPS-Trap-FcS) aus dem Vektor pMT/Hygro/LPS-Trap-

Fc inklusive dem Flag-Tag amplifiziert. Durch die Primer wurden N- und C-terminal *SpeI* Restriktionsschnittstellen in die verkürzte TLR4 Sequenz eingefügt. Die Flag-TLR4-DNA konnte anschließend mit *SpeI* komplett bis zum Anfang des flexiblen Linkers aus pMT/Hygro/LPS-Trap-Fc ausgeschnitten und die verkürzten TLR4-Sequenzen eingefügt werden.

S2 Zellen wurden anschließend stabil mit den LPS-Trap-FcM und –FcS Expressionsvektoren transfiziert. Die verkürzten Fusionsproteine konnten mit Protein G aus den Überständen isoliert und mit der LPS-Trap-Fc als Vergleich über ein SDS-Gel aufgetrennt werden. Die einzelnen Fraktionen zeigten Banden von ca. 105 kDa (LPS-Trap-FcM) und 100 kDa (LPS-Trap-FcS) (Abb. 4.34). Wie erhofft waren auch die Ausbeuten gegenüber den LPS-Trap-Fc Fraktionen deutlich erhöht (Abb. 4.34).



**Abb. 4.34: Gereinigte LPS-Trap-FcM und –FcS im SDS-Gel**

Überstände von LPS-Trap-Fc, -FcM und –FcS transfizierten S2-Zellen wurden über eine Protein G Säule gereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden im SDS-Gel analysiert. Die Proteinfärbung erfolgte mit SYPRO Red Protein Gel Stain.

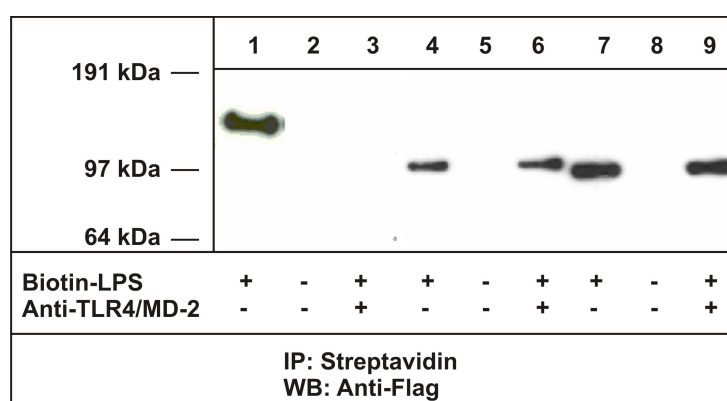
#### 4.4.1.2 Charakterisierung der verkürzten Fusionsproteine LPS-Trap-FcM und –FcS

In den nächsten Schritten sollten die Eigenschaften der verkürzten Fusionsproteine genauer untersucht werden. Analog zur LPS-Trap-Fc zeigten auch die verkürzten Proteine Oligomerenbildung nach ihrer Reinigung (Daten nicht gezeigt, vgl. 4.1.2.4.1). Die Verkürzungen des C-Terminus von TLR4 brachten in dieser Hinsicht folglich keine Verbesserung. Die folgenden Untersuchungen wurden deshalb ausschließlich mit Zellüberständen durchgeführt.

#### 4.4.1.2.1 LPS-Bindung durch LPS-Trap-FcM und -FcS

Zur Überprüfung der LPS-Bindungsfähigkeit der verkürzten Fusionsproteine wurde ein LPS Pull-down-Assay durchgeführt. Überstände LPS-Trap-Fc, -FcM und -FcS transfizierter S2 Zellen wurden in Anwesenheit von 10% FCS 1h mit Biotin-LPS inkubiert. Das LPS wurde anschließend mit Streptavidin immunpräzipitiert und die Präzipitate im Anti-Flag Western Blot analysiert.

Sowohl die LPS-Trap-FcM (Spur 4) als auch die LPS-Trap-FcS (Spur 7) konnten wie die LPS-Trap-Fc (Spur 1) das biotinylierte LPS binden (Abb. 4.35). Diese Bindung ließ sich aber im Gegensatz zur LPS-Trap-Fc (Spur 3) durch die Vorinkubation mit Anti-TLR4/MD-2-Antikörper nicht neutralisieren (Abb. 4.35, Spur 6 und 9). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der TLR4/MD-2 Komplex von den mutierten Fusionsproteinen nicht gebildet wurde und die LPS-Bindungsaffinität wahrscheinlich geringer als die der LPS-Trap-Fc ist.



**Abb. 4.35: Untersuchung der LPS-Bindung von LPS-Trap-FcM und -FcS**

Überstände LPS-Trap-Fc (Spur 1-3), -FcM (Spur 4-6) und -FcS (Spur 7-9) transfizierter S2-Zellen wurden mit biotinylierten LPS inkubiert. Nach der Immunpräzipitation mit Streptavidin wurden die Präzipitate im Anti-Flag Western Blot analysiert. Mit Anti-TLR4/MD-2 vorinkubierte Überstände dienten als Konformationskontrolle für den TLR4/MD-2 Komplex (Spur 3, 6 und 9).

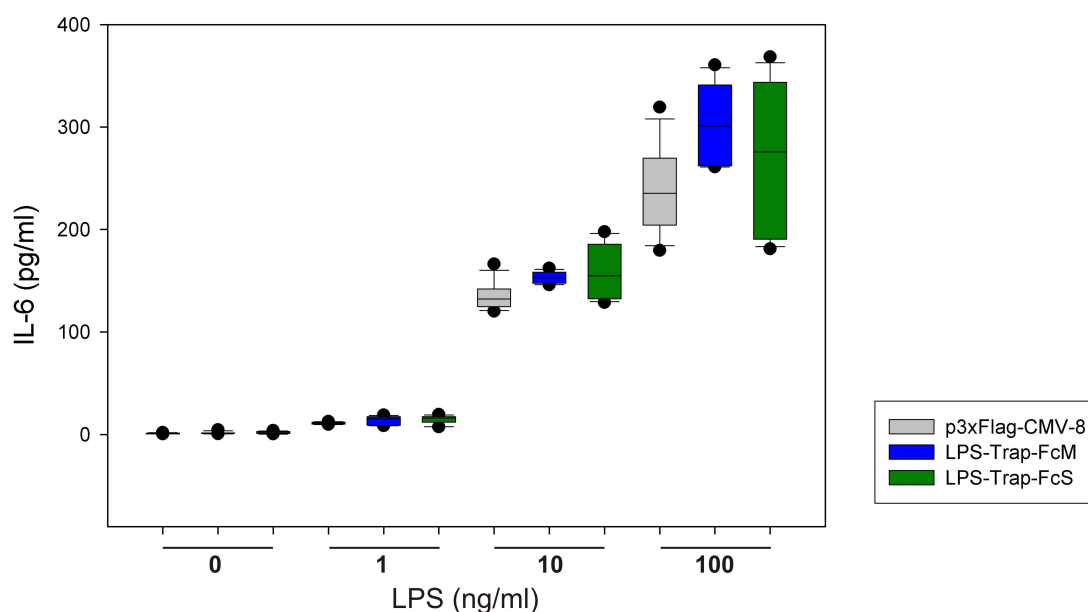
#### 4.4.1.2.2 Fehlende hemmende Wirkung der verkürzten Fusionsproteine *in vitro*

Trotz der fehlenden TLR4/MD-2 Komplexbildung sollte die biologische Aktivität der LPS-Trap-FcM und -FcS im Zellkulturmodell überprüft werden. Da hierfür wieder das Transwell-Modell angewendet wurde, musste die LPS-Trap-FcM und -FcS zunächst in einen Expressionsvektor für Säugerzellen kloniert werden.

Die Sequenzen wurden über eine PCR mit den Primern (1) und (16) um die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *BamHI* erweitert. Das PCR-Produkt wurde

anschließend in den entsprechend verdauten Expressionsvektor p3xFlag-CMV-8 eingefügt.

HEK293T Zellen wurden mit den generierten LPS-Trap-FcM, -FcS oder leeren Expressionsvektoren transfiziert und 8 h später in 24-well Platten umgesetzt. In Transwells wurden MM-6-Zellen 48 h mit den transfizierten HEK293T kokultiviert. Die Stimulation erfolgte mit 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml LPS über Nacht. Anschließend wurde die IL-6-Konzentration im Überstand mittels ELISA vermessen. Die verkürzten Fusionsproteine zeigten gegenüber den Kontrollen keine Hemmung der proinflammatorischen Reaktion (Abb. 4.36). Bei steigenden LPS-Konzentrationen war sogar eine leichte Erhöhung der IL-6-Konzentration im Überstand messbar. Das LPS hatte demnach eine höhere Affinität zu zellulärem TLR4/MD-2 als zu den Fusionsproteinen.



**Abb. 4.36: Messung der biologischen Aktivität der verkürzten Fusionsproteine**

Mit LPS-Trap-FcM oder -FcS transfizierte HEK293T wurden mit MM6-Zellen 48 h kokultiviert und anschließend über Nacht mit den angegebenen Konzentrationen an LPS stimuliert. Die Messung der IL-6-Spiegel im Zellüberstand wurde per ELISA durchgeführt. Mit leerem p3xFlag-CMV-8 transfizierte HEK293T dienten als Kontrollen. n=8

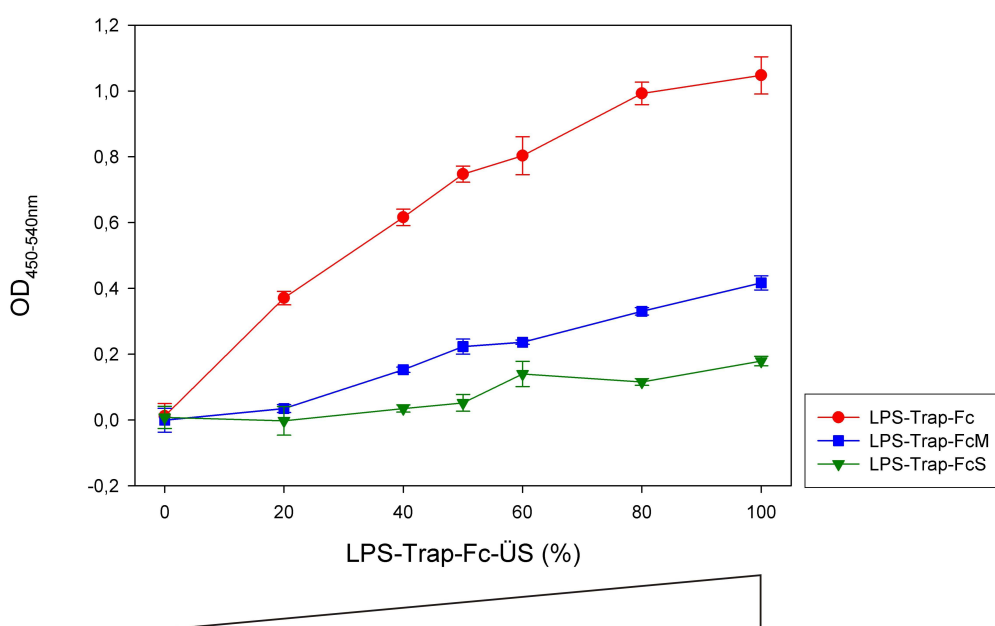
#### 4.4.1.2.3 Verminderte LPS-Bindungsstärke im Vergleich zur LPS-Trap-Fc

Um die Affinitäten der LPS-Trap-Fc, -FcM und -FcS direkt miteinander zu vergleichen, wurde auf den LPS-Bindungs-ELISA zurückgegriffen. Hierfür wurden zunächst Zellüberstände transfizierter S2-Zellen mit Hilfe eines LPS-Trap-Fc-ELISAs



auf die gleiche Menge an Fusionsprotein eingestellt (vgl. 4.1.2.4.3). Anschließend wurden Verdünnungsreihen der eingestellten Überstände in Anti-Flag-Antikörper beschichteten Platten inkubiert. Nach dem Entfernen der Überstände folgte die Inkubation mit Biotin-LPS und die anschließende Detektion des gebundenen Endotoxins mit Streptavidin-HRP.

Die LPS-Bindungsassays zeigten deutlich die verminderte Affinität von LPS zu den verkürzten Fusionsproteinen (Abb. 4.37). Die Bindung von LPS zur LPS-Trap-FcS war über die gesamte Verdünnungsreihe, ebenso wie bei der LPS-Trap-FcM bei stärkeren Verdünnungen, kaum nachweisbar. Trotz der grundsätzlichen Fähigkeit LPS zu binden, sind die verkürzten Fusionsproteine demnach nicht in der Lage den LPS/MD-2-Komplex zu stabilisieren und eine kompetitive Hemmung gegenüber zellständigen TLR4/MD2-Rezeptorkomplexen zu erreichen.



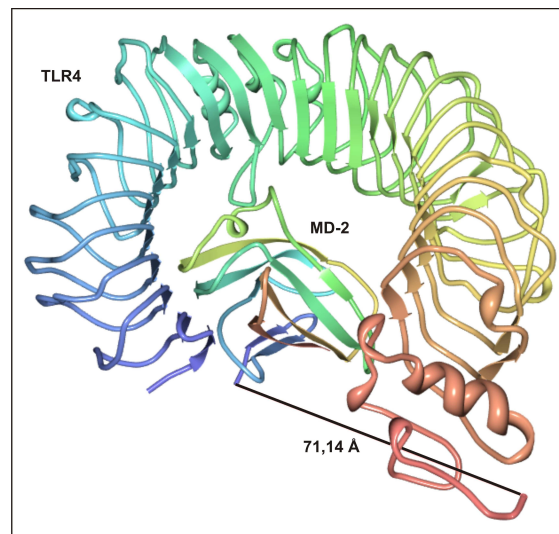
**Abb. 4.37: Relative LPS-Bindungsstärken von LPS-Trap-Fc, -FcM und -FcS**

Verdünnungen eingestellter LPS-Trap-Fc, -FcM und Fc-S-haltiger S2-Überstände wurden auf eine mit Anti-Flag-Antikörper beschichtete Platte gegeben und die gebundenen Fusionsproteine anschließend mit Biotin-LPS inkubiert. Das gebundene LPS konnte durch Streptavidin-HRP und anschließender chromogener Reaktion durch Absorptionsmessungen bei 450 nm und 540 nm quantifiziert werden. Die gezeigten Punkte stellen Mittelwerte von Quadruplikaten plus/minus SD dar.

#### 4.4.2 Variationen am flexiblen Linker

Ein weiterer Ansatzpunkt für Veränderungen an der LPS-Trap-Fc ist der flexible Linker zwischen TLR4 und MD-2. Dieser wurde in Hinsicht auf Flexibilität und

Länge willkürlich ausgewählt. Die inzwischen bekannte Kristallstruktur des TLR4/MD-2 Komplexes zeigt, dass der C-Terminus von TLR4 relativ weit (71,14 Å) vom N-Terminus des MD-2 entfernt liegt (Abb. 4.38) [37]. Deshalb wurde erwogen, den Linker von 15 AS auf 30 AS zu verlängern. Ebenso sollte ein flexibler Linker (GGGGS-GGGGS-GGGGS) an den C-Terminus von MD-2 eingebaut werden, um eine eventuelle sterische Behinderung des TLR4/MD-2 Komplexes durch das IgG-Fc-Fragment zu vermindern.



**Abb. 4.38: Die räumliche Anordnung des TLR4/MD-2 Komplexes**

Die N-Termini der Proteine sind bläulich, die C-Termini rötlich gekennzeichnet. Die schwarze Linie kennzeichnet den Abstand zwischen TLR4 und MD-2.

Modifiziert aus Protein Data Bank nach [37]

#### 4.4.2.1 Klonierung der Linkermutanten LPS-Trap-L-Fc, LPS-Trap-Fc(30AS) und LPS-Trap-L-Fc(30AS)

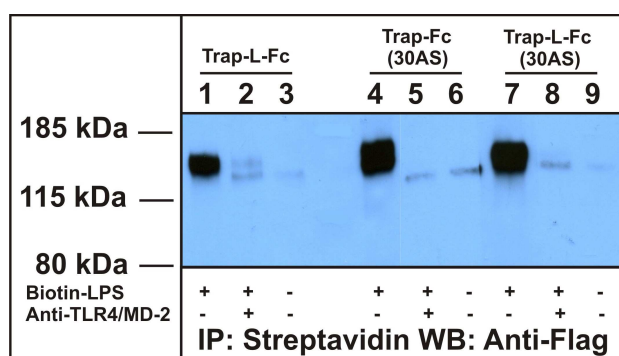
Für den Einbau des flexiblen Linkers zwischen MD-2 und dem IgG-Fc-Fragment wurde der Vektor pIRESneo3/LPS-Trap-Fc durch das Restriktionsenzym *AgeI* direkt nach der MD-2-Sequenz aufgeschnitten und mit SAP dephosphoryliert. Ein künstliches, phosphoryliertes Oligonukleotid aus den Sequenzen (1) und (2) konnte durch die entsprechenden Nukleotidüberhänge in den Vektor ligiert werden (LPS-Trap-L-Fc).

Die Verlängerung des vorhandenen Linkers erfolgte durch einen Schnitt mit *XhoI* direkt vor der MD-2-Sequenz, anschließender Dephosphorylierung und Einbau eines Oligonukleotids aus den Sequenzen (7) und (8) (LPS-Trap-Fc(30AS)).

Zusätzlich wurden noch die LPS-Trap-L-Fc(30AS) durch den kombinierten Einbau beider Linker generiert.

#### 4.4.2.2 Expression und LPS-Bindungsfähigkeit der Linkermutanten

Die neu konstruierten Expressionsvektoren wurden in QBI293A transfiziert. Nach einer 14-tägigen Selektion mit G418 wurde mit den Zellüberständen ein LPS Pull-down-Assay durchgeführt. Die Streptavidin-Präzipitate wurden in einem SDS-Gel augetrennt und im Anti-Flag Western Blot analysiert. Alle drei Varianten des Fusionsproteins konnten im Western Blot nachgewiesen werden und banden somit LPS (Abb. 4.39, Spur 1, 4, 7). Darüber hinaus konnte die Interaktion mit LPS durch die Vorinkubation mit Anti-TLR4/MD-2 neutralisiert werden, was auf eine Bildung des nativen TLR4/MD-2 Komplexes schließen ließ (Abb. 4.39, Spur 2, 5, 8).



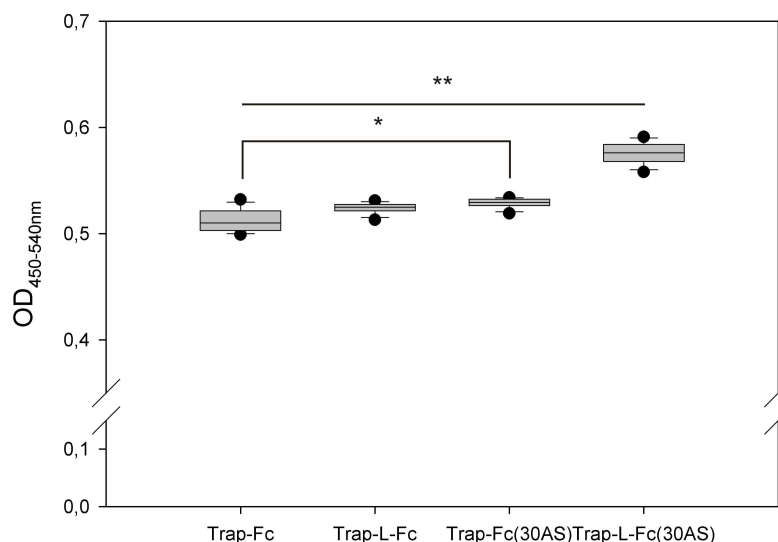
**Abb. 4.39: LPS Pull-down der Linkermutanten**

Überstände von LPS-Trap-L-Fc, LPS-Trap-Fc(30AS) und LPS-Trap-L-Fc(30AS) transfizierten QBI293A wurden mit Biotin-LPS inkubiert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit Streptavidin-Sepharose durchgeführt und die Präzipitate im Anti-Flag Western Blot analysiert. Als Konformationskontrolle wurden die Überstände mit neutralisierendem Anti-TLR4/MD-2-Antikörper vorinkubiert. Unbehandelte Überstände dienten als Negativkontrolle.

#### 4.4.2.3 Schwache Erhöhung der LPS-Affinität zu den 30AS-Linkermutanten

Im direkten Vergleich der LPS-Affinitäten der Linkermutanten mit der LPS-Trap-Fc sollte überprüft werden, ob eine Verbesserung der LPS-Bindung durch die neuen Linker erzielt wurde. Hierfür wurden Überstände der jeweiligen QBI293A-Transfektanden mit Hilfe des LPS-Trap-Fc-ELISAs auf die gleiche Menge an Fusionsprotein eingestellt. Mit den abgeglichenen Überständen konnte anschließend ein LPS-Bindungs-ELISA (siehe 4.1.2.4.3) durchgeführt werden. Die LPS-Trap-Fc(30AS) zeigte gegenüber der LPS-Trap-Fc eine schwache, aber signifikante

Verbesserung der LPS-Bindung (Abb. 4.40). Die LPS-Trap-L-Fc(30AS) war allen Varianten in ihrer LPS-Bindung signifikant überlegen (Abb. 4.40).



**Abb. 4.40: LPS-Bindungs-ELISA der Linkermutanten im Vergleich mit der LPS-Trap-Fc**

Abgeglichene Überstände der Linkervarianten und der LPS-Trap-Fc wurden in Anti-Flag beschichtete ELISA-Platten gegeben. Die fixierten Proteine wurden mit biotinylierten LPS inkubiert und mit Streptavidin-HRP detektiert. Die Stärke der LPS-Bindung konnte über die Absorption bei den Wellenlängen 450-540nm bestimmt werden. \*  $p=0,006$ , \*\*  $p<0,001$ , Varianzanalyse: ANOVA, Post-Hoc Analyse: Tukey-Test,  $n=8$

## 4.5 Untersuchung und Charakterisierung von adenoviral-produzierter LPS-Trap-Fc im Tiermodell

Der Einsatz von rekombinanter LPS-Trap-Fc im Tiermodell erwies sich mit den untersuchten Methoden als unmöglich. Die Reinigung biologisch aktiver LPS-Trap-Fc über Protein G aus Zellüberständen erwies sich als unmöglich. Die Isolierung der His-LPS-Trap-Fc im basischem Milieu führte zwar zum Erhalt der biologischen Aktivität des Fusionsproteins, aber es konnte nicht die hohe Reinheit von Protein G-isolierter LPS-Trap-Fc erreicht werden (vgl. 4.1.2.4.3). Zwar konnten höhere Produktionsausbeuten mit verkürzten Varianten der LPS-Trap-Fc erzielt werden, diese zeigten aber ebenfalls Oligomerisierungsphänomene und waren biologisch inaktiv (vgl. 4.4.2). Ein weiteres Problem wäre die unvermeidliche Kontamination mit Endotoxinen während des Reinigungsvorgangs. Mit einem LPS-Trap-Fc exprimierenden Adenovirus (Ad-LPS-Trap-Fc) könnte das Fusionsprotein (LPS-Trap-

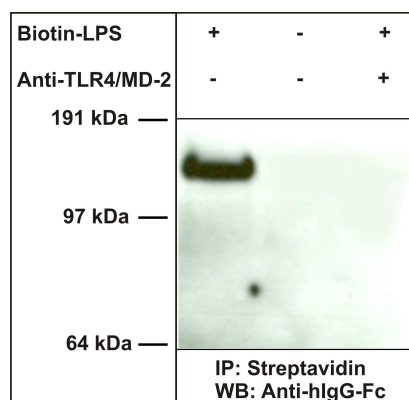
Fc(Ad)) direkt im Versuchstier produziert und die Problematik der Kontaminationen und der zu geringen Ausbeuten umgangen werden.

#### 4.5.1 Charakterisierung der LPS-Trap-Fc(Ad) *in vitro*

Ein LPS-Trap-Fc exprimierendes Adenovirus wurde freundlicherweise von Bernd Schnabl, Regensburg, zur Verfügung gestellt [152].. Die Eigenschaften der adenoviral produzierten LPS-Trap-Fc(Ad) sollten zunächst *in vitro* charakterisiert werden.

##### 4.5.1.1 LPS-Trap-Fc(Ad) bildet den TLR4/MD-2 Komplex und bindet LPS

Die LPS-Trap-Fc steht im adenoviralen Vektor unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und folgt einer Preprotrypsin-Signalsequenz, die zur Sekretion des rekombinanten Proteins in den Überstand führt. Der überlassene Adenoviren-Stock wurde in QBI293A-Zellen vermehrt. Mit Überständen dieser Zellen wurde ein LPS Pull-down-Assay durchgeführt (siehe 4.1.2.2.). Die LPS-Trap-Fc(Ad) ließ sich über LPS-Biotin/Streptavidin immunpräzipitieren und die Bindung konnte durch die vorherige Inkubation der Überstände mit Anti-TLR4/MD-2 neutralisiert werden (Abb. 4.41). Das adenoviral produzierte Protein interagierte demnach mit LPS und formte den TLR4/MD-2 Komplex.

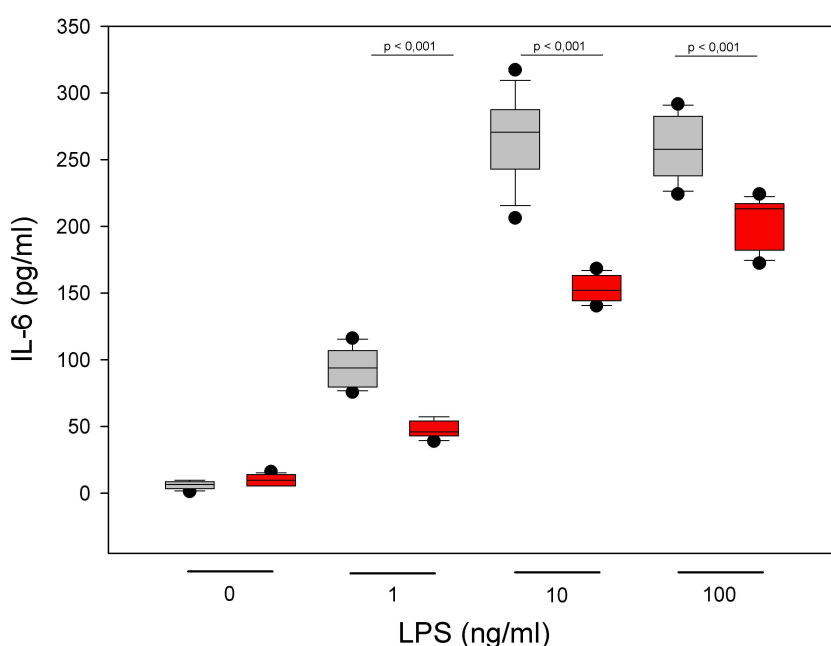


**Abb. 4.41: Die Ad-LPS-Trap-Fc bindet LPS und bildet den TLR4/MD-2 Komplex**

Überstände von Ad-LPS-Trap-Fc infizierten QBI293A wurden mit biotinylierten LPS inkubiert und anschließend mit Streptavidin-Sepharose immunpräzipitiert. Als Kontrolle dienten mit Anti-TLR4/MD-2 vorinkubierte (Konformationskontrolle) oder unbehandelte Überstände (Negativkontrolle). Die Auftrennung erfolgte im SDS-Gel und mit anschließender Detektion im Anti-hlgG-Fc Western Blot.

#### 4.5.1.2 Biologische Aktivität im *in vitro*-Modell

Über die LPS-Bindung hinaus sollten die hemmenden Eigenschaften der LPS-Trap-Fc(Ad) auch noch im Zellmodell bestätigt werden. Hierfür wurden QBI293A-Zellen mit LPS-Trap-Fc exprimierenden Adenoviren infiziert und noch vor der Lyse der Zellen die Überstände abgenommen, um die Viruskonzentration möglichst gering zu halten. MM6-Zellen wurden in den konditionierten Überständen kultiviert und mit 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml LPS über Nacht stimuliert. Überstände Adeno- $\beta$ -Galactosidase (Ad- $\beta$ -Gal) infizierter Zellen dienten als Kontrolle. Das Maß der LPS-Stimulation wurde über die IL-6 Konzentration im Überstand bestimmt. Die Ad-LPS-Trap-Fc konditionierten MM-6 sezernierten unter allen Stimulationsbedingungen signifikant weniger IL-6, als ihre Ad- $\beta$ -Gal Kontrollen (Abb. 4.42). Folglich war die LPS-Trap-Fc(Ad) in Hinsicht auf Konformation und biologischer Aktivität mit den nicht-viral produzierten Fusionsproteinen vergleichbar.



**Abb. 4.42:** Die LPS-Trap-Fc(Ad) hemmt eine LPS-induzierte proinflammatorische Reaktion *in vitro*

MM6 wurden mit Überständen Ad-LPS-Trap-Fc (rot) oder Ad- $\beta$ -Gal infizierter QBI293A über Nacht in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an LPS kultiviert. Die IL-6 Spiegel im Überstand erfolgte mittels ELISA.  $p < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test,  $n=8$

#### 4.5.2 Test der Ad-Trap-Fc *in vivo*

Mit den gewonnenen hochtitrigen Stocks an Ad-LPS-Trap-Fc sollte nun ein erster Pilotversuch *in vivo* unternommen werden. Hierfür wurden je vier CD-1 Mäusen entweder  $10^8$  PFU Ad-LPS-Trap-Fc oder das entsprechende Volumen PBS retrobulbär injiziert. Vier Tage nach der Infektion erfolgte die Stimulation mit je  $1\ \mu\text{g}$  LPS i.v. und die Blutung der Mäuse nach einer weiteren Stunde. Anschließend wurde das Serum gewonnen und der TNF-Spiegel mittels ELISA untersucht.

Nur eine Ad-LPS-Trap-Fc behandelte Maus zeigte verminderte TNF-Serumspiegel gegenüber den kontrollbehandelten Tieren (Daten nicht gezeigt). Die Überprüfung der Sera auf die LPS-Trap-Fc(Ad) im Anti-Flag Western Blot nach vorausgegangener Immunpräzipitation durch Anti-Flag-M2 Agarose zeigte keine Banden des Fusionsproteins mit Ausnahme der oben erwähnten Maus (Daten nicht gezeigt). Die Zahl der verabreichten Viren schien zu gering für eine massive Produktion der LPS-Trap-Fc(Ad) gewesen zu sein.

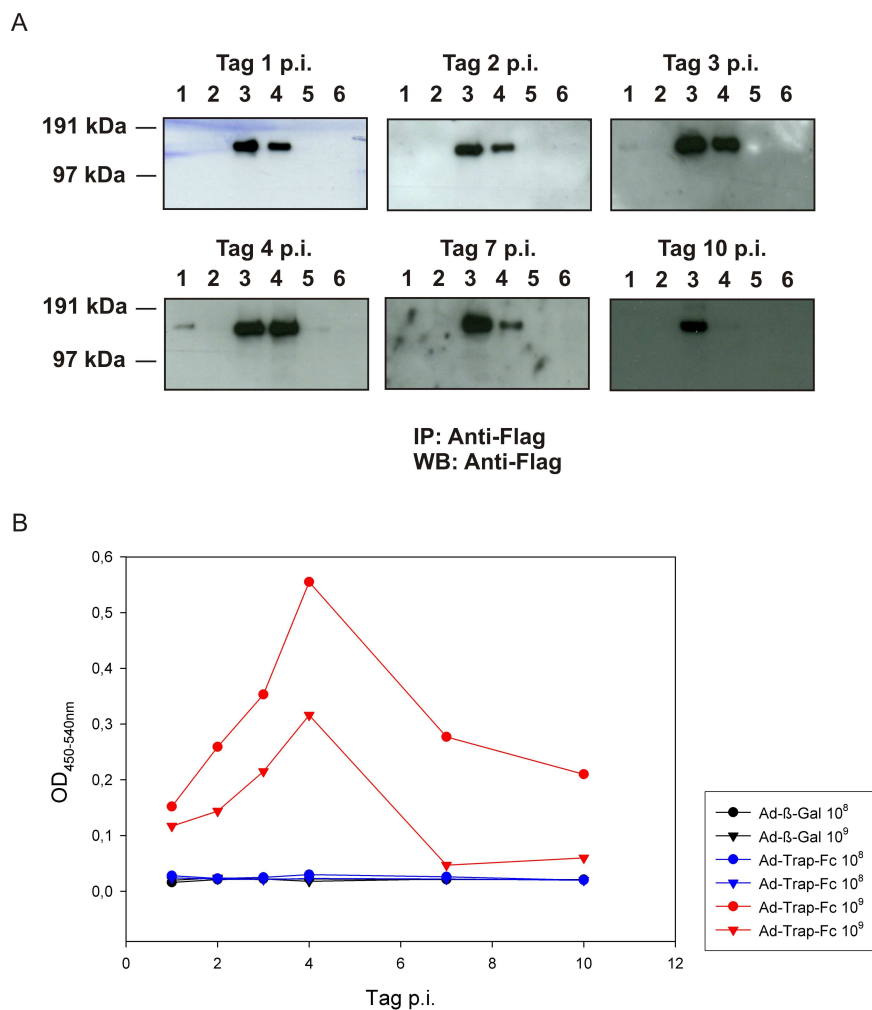
##### 4.5.2.1 Verlauf der LPS-Trap-Fc(Ad) Serumspiegel im Mausmodell

Aufgrund der im Pilotexperiment gewonnen Erkenntnisse sollten die notwendigen Virentiter genauer bestimmt und der Verlauf der LPS-Trap-Fc(Ad) Serumspiegel beobachtet werden. Für diesen Zweck wurden je eine CD-1 Maus mit  $10^8$  bzw.  $10^9$  PFU Ad- $\beta$ -Gal und je zwei Tiere mit  $10^8$  und  $10^9$  PFU Ad-LPS-Trap-Fc infiziert. Die Tiere wurden an den Tagen 1, 2, 3, 4, 7 und 10 p.i. geblutet und die Sera gewonnen.

Ein Teil der Sera wurde mit PBS verdünnt und die LPS-Trap-Fc(Ad) mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden in Laemmli-Puffer gekocht, im SDS-Gel aufgetrennt und das Protein im Anti-Flag Western Blot detektiert.  $10^8$  Ad-LPS-Trap-Fc führten bei Maus 1 zu einer schwachen Bande an den Tagen 3 und 4 p.i., während im Serum von Maus 2 kein Fusionsprotein nachweisbar war (Abb. 4.43, A, Spur 1 und 2). Wurden die Mäuse mit  $10^9$  Viren infiziert, war ab Tag 1 p.i. LPS-Trap-Fc(Ad) im Serum vorhanden (Abb. 4.43, A, Spur 3 und 4). Nach Tag 4 p.i. reduzierten sich die Serumspiegel in Maus 2 aber rapide, so dass am Tag 10 p.i. kein Protein mehr detektierbar war (Abb. 4.43, A, Spur 4). Auch in Maus 1 nahmen die Serumspiegel nach Tag 7 p.i. ab. Das Serum kontrollinfizierter Mäuse zeigte erwartungsgemäß keine Bande.



Um die LPS-Trap-Fc Konzentrationen im Serum relativ zueinander besser abschätzen zu können, wurde ein LPS-Trap-Fc ELISA durchgeführt. Anti-Flag diente als Fang-Antikörper. Die gebundene LPS-Trap-Fc(Ad) konnte über einen Anti-hlgG-Fc Antikörper detektiert werden. Auch hier zeigte sich in den mit  $10^9$  Adenoviren infizierten Mäusen, dass die Konzentration des Fusionsproteins um Tag 4 p.i. das Maximum erreicht und danach stetig abnimmt (Abb. 4.43, B, rote Linie). In den restlichen Sera war kein Fusionsprotein nachweisbar (Abb. 4.43, B, blaue und schwarze Linie).



**Abb. 4.43: Verlauf der LPS-Trap-Fc(Ad) Konzentrationen im Serum infizierter Mäuse**

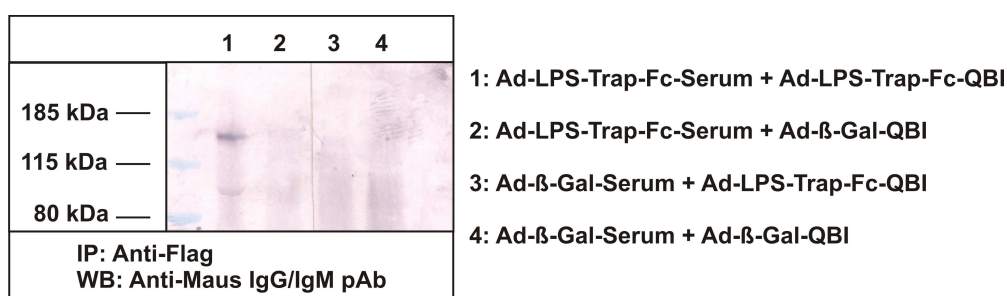
CD-1 Mäuse wurden mit Ad-LPS-Trap-Fc oder Ad-β-Gal infiziert, zu den aufgeführten Tagen geblutet und die Sera gewonnen.

(A) Die LPS-Trap-Fc(Ad) wurde aus Sera von mit  $10^8$  (Spur 1 und 2) oder  $10^9$  (Spur 3 und 4) PFU Ad-LPS-Trap-Fc bzw. Ad-β-Gal (Spur 5 und 6) infizierten Mäusen mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert und im Anti-Flag Western Blot detektiert.

(B) Anti-Flag-Antikörper beschichtete ELISA-Platten wurden mit den entsprechenden Sera infizierter Mäuse inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Anti-hlgG-Fc Antikörper und anschließender chromogener Reaktion. Die Extinktions-Differenzen der Wellenlängen 450 nm und 540 nm sind angegeben.

#### 4.5.2.2 Rapide Bildung von Antikörpern gegen die LPS-Trap-Fc(Ad)

Da die LPS-Trap-Fc(Ad) Serumspiegel infizierter Mäuse überraschend schnell abnahmen, sollte untersucht werden, ob Antikörper gegen das Fusionsprotein gebildet wurden. Zu diesem Zweck wurde Serum von Ad-LPS-Trap-Fc (Spur 1 und 2) oder Ad- $\beta$ -Gal (Spur 3 und 4) infizierten Mäusen vom Tag 7 p.i. mit Überständen Ad-LPS-Trap-Fc (Spur 1 und 3) oder Ad- $\beta$ -Gal (Spur 2 und 4) infizierter QBI293A-Zellen 1 h inkubiert. Die LPS-Trap-Fc(Ad) und gegen das Fusionsprotein gerichtete Antikörper konnten auf diese Weise mit Anti-Flag Agarose koimmunpräzipitiert werden. Die Präzipitate wurden im SDS-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Im Anti-mIgG/IgM Western Blot konnte aus dem Präzipitat Ad-LPS-Trap-Fc/Serum und Ad-LPS-Trap-Fc/QBI293A eine Antikörper-Bande bei ca. 150 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4.44, Spur 1). Ein Grund für den raschen Rückgang der LPS-Trap-Fc(Ad)-Serumspiegel lag also an der frühen Antikörperbildung gegen das Fusionsprotein.

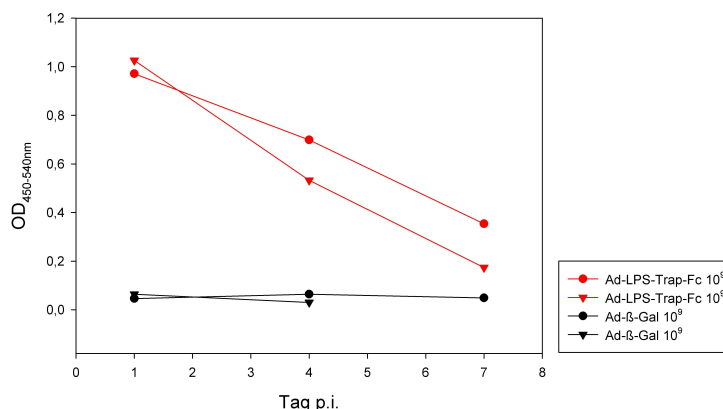


**Abb. 4.44: Antikörper gegen die LPS-Trap-Fc im Serum infizierter Mäuse**

Überstände und Sera Adenoviren-infizierter Zellen bzw. Mäuse wurden in den entsprechenden Kombinationen miteinander inkubiert. Die LPS-Trap-Fc(Ad) wurde mit Anti-Flag Agarose immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Protein assoziierte Antikörper im Anti-Maus-IgG/IgM Western Blot detektiert.

Um den Antikörper-induzierten Abbau der LPS-Trap-Fc(Ad) zu verhindern, wurden je zwei *Fox Chase* SCID-Mäuse mit Ad-LPS-Trap-Fc und Kontrollvirus infiziert und der Serumspiegelverlauf von LPS-Trap-Fc(Ad) über 7 Tage hinweg mittels ELISA kontrolliert (siehe 4.5.2.1). Diese Mäuse verfügen aufgrund eines Gendefekts weder über B- noch T-Lymphozyten. Erstaunlicherweise erreichten die LPS-Trap-Fc(Ad)-Serumkonzentrationen bereits am Tag 1 p.i. ihr Maximum und nahmen in den darauffolgenden Tagen kontinuierlich ab (Abb. 4.45). Demzufolge waren nicht nur Antikörper für den schnellen Abbau des Fusionsproteins

verantwortlich. Vielmehr scheint die vireninduzierte Proteinproduktion außerordentlich schnell zum Erliegen zu kommen.



**Abb. 4.45: Verlauf der LPS-Trap-Fc(Ad) Serumspiegel in einer Fox Chase SCID Maus**

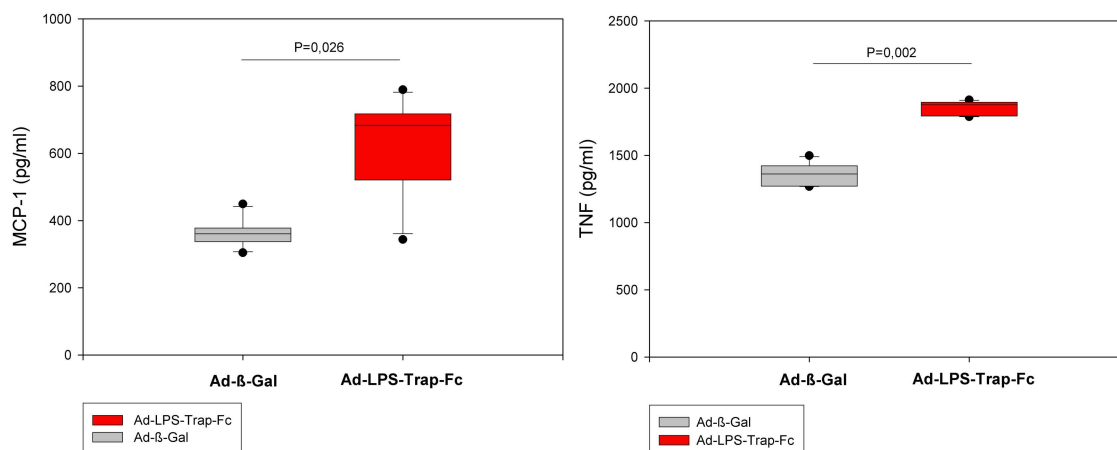
Immuninkompetente SCID Mäuse wurden mit  $10^9$  PFU Ad-LPS-Trap-Fc oder Ad-β-Gal infiziert, zu den angegebenen Tagen geblutet und die Sera gewonnen. Die LPS-Trap-Fc(Ad)-Serumspiegel wurden wie in Abb. 4.43 (B) bestimmt.

#### 4.5.2.3 Einfluss auf die LPS-induzierte Zytokinantwort

Nach der Charakterisierung der LPS-Trap-Fc(Ad) *in vitro* und *in vivo* sollten in der nächsten Versuchsreihe je sechs CD-1 Mäuse mit  $10^9$  PFU Ad-LPS-Trap-Fc oder Ad-β-Gal (Kontrolle) infiziert und die LPS-induzierte Immunreaktion untersucht werden. Durch die schnelle Bildung von Antikörpern gegen die LPS-Trap-Fc(Ad) und dem Versiegen der Proteinproduktion durch die Adenoviren musste die LPS-Stimulation bereits am Tag 4 p.i. erfolgen.

Die Adenoviren und das hochreine LPS (1 µg) wurden retrobulbär am jeweils anderen Auge verabreicht. Eine Stunde nach der LPS-Stimulation wurden die Tiere geblutet. Das gewonnene Serum wurde auf TNF, IL-1α, IL-1β, IL-12 und MCP-1 im Luminex Multiplex Bio-Assay Analyzer untersucht. Überraschenderweise zeigten die Ad-LPS-Trap-Fc behandelten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant höhere TNF- und MCP-1 Serumspiegel (Abb. 4.46). Diese Ergebnisse wurden auch durch das makroskopisch erkennbare Befinden der Mäuse unterstrichen. So zeigten Ad-LPS-Trap-Fc infizierte Tiere durch ihre aufgerichtete Körperbehaarung und den flüssigen Stuhl deutlich stärkere Anzeichen einer Fieberreaktion. Die übrigen untersuchten Zytokine waren zu diesem Zeitpunkt erwartungsgemäß noch nicht

detektierbar. In zwei weiteren Experimenten konnten diese überraschenden Daten, die im Gegensatz zum Pilotexperiment stehen, bestätigt werden.



**Abb. 4.46:** Die Ad-LPS-Trap-Fc verstärkt die LPS-induzierte proinflammatorische Reaktion *in vivo*

CD-1 Mäuse wurden mit  $10^9$  Ad-β-Gal (grau) oder Ad-LPS-Trap-Fc (rot) infiziert und am Tag 4 p.i. mit  $1 \mu\text{g}$  LPS stimuliert. Die Serumkonzentrationen von TNF und MCP-1 wurden im Luminex Multiplex Bio-Assay Analyzer bestimmt.  $p=0,028$  bzw.  $0,002$ , Mann-Whitney-U-Test,  $n=6$

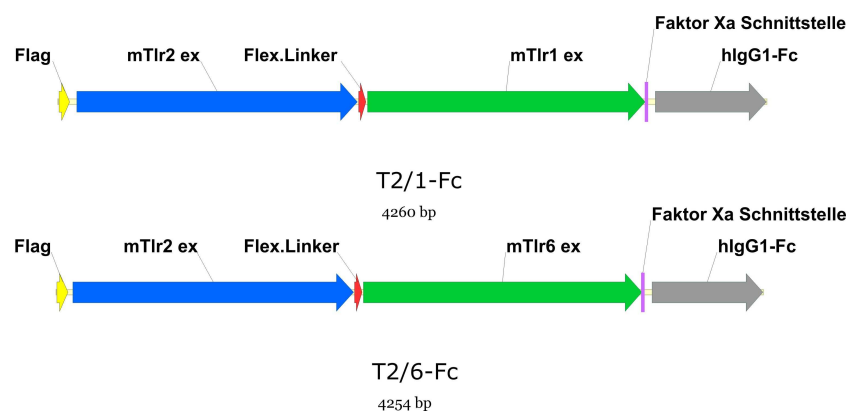
## 4.6 TLR2-Fusionsproteine

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Konstruktion und Testung von TLR2-Fusionsproteinen. TLR2 spielt als Rezeptor für bakterielle Lipopeptide eine Schlüsselrolle bei Gram-positiven bzw. gemischt-bakteriellen Infektionen. Die Daten über die hemmende Wirkung von löslichen TLR2-Fc Fusionsproteinen sind widersprüchlich [118; 120]. Da TLR2 funktionelle Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 bildet und so auch zwischen di- und triacylierten Lipopeptiden unterscheidet [47; 48], sollten Fusionsproteine aus den extrazellulären Teilen von TLR2 mit TLR1 bzw. TLR6 konstruiert werden.

### 4.6.1 Klonierung von TLR2/1-Fc und TLR2/6-Fc Fusionsproteinen

Die Sequenzen von Maus-TLR1 (Primer (25) und (26)) und -TLR6 (Primer (27) und (28)) wurden mittels PCR aus der cDNA von RAW264.7-Zellen gewonnen. Der extrazelluläre Teil von TLR1 wurde mit den Primern (13) und (22), derjenige von TLR6 mit den Primern (17) und (24) amplifiziert und um die angegebenen Schnittstellen erweitert. In den extrazellulären Teil von TLR2 wurde C-terminal über

eine PCR aus dem Templat Flag T2Fc in pMT/BiP/V5-His C mit dem Primer (23) die Restriktionsschnittstelle für *BsiWI* und N-terminal eine *KpnI*- (für T2/1-Fc) über den Primer (15) bzw. eine *BglII* Schnittstelle (für T2/6-Fc) über den Primer (14) eingefügt. Die Amplifikate wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut und zusammen mit dem flexiblen Linkern (aus den Oligonukleotiden (3) und (4) in einem Schritt in den Vektor p3xFlag-CMV-8 eingefügt. Anschließend wurden die C-Termini von TLR1 bzw. TLR6 nach Schnitten mit *XbaI* (T2/1) bzw. *KpnI* (T2/6) um das hlgG-Fc-Fragment, das mit den Primern (3) und (19) bzw. (2) und (18) aus LPS-Trap-Fc in pMT/BiP/V5-His C mittels PCR gewonnen wurde, erweitert (Abb. 4.47).

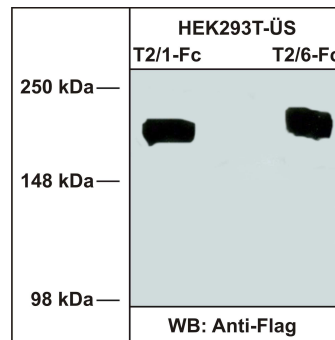


**Abb. 4.47: Konstruktion der T2/1- und T2/6-Fc**

Der extrazelluläre Teil von Maus (m) TLR2 wurde über einen flexiblen Linker (GGGGS-GGGGS-GGGGS) mit den extrazellulären Fragmenten von mTLR1 bzw. mTLR6 verknüpft. C-terminal wurde ein humanes (h) IgG-Fc-Fragment angefügt.

#### 4.6.2 Expression von T2/1- und T2/6-Fc

HEK293T-Zellen wurden mit p3xFlag-CMV-8/T2/1-Fc bzw. -T2/6-Fc Expressionsvektoren transfiziert. 48 h später wurden Überstände abgenommen und unter reduzierenden Bedingungen über ein SDS-Gel aufgetrennt. Im Anti-Flag Western Blot konnten die Banden der Fusionsproteine bei ca. 180 kDa identifiziert werden (Abb. 4.48). Die T2/1- und T2/6-Fc ließen sich folglich in Säugerzellen exprimieren und wurden in löslicher Form in den Zellüberstand sezerniert.

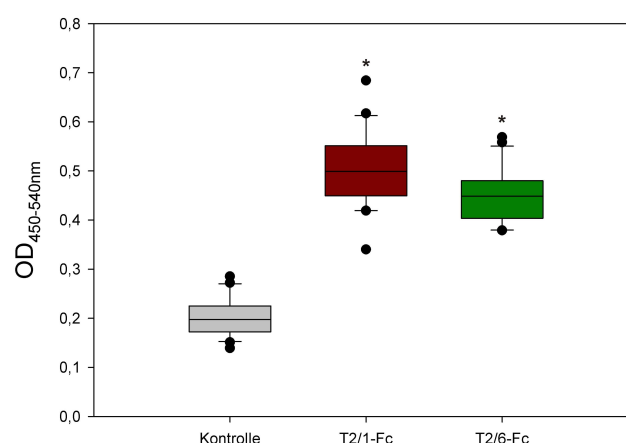


**Abb. 4.48: Expression der T2/1- und T2/6-Fc in HEK293T-Zellen**

Überstände von T2/1- und T2/6-Fc HEK293T-Transfektanten wurden 48 h nach ihrer Transfektion im Western Blot mit einem Anti-Flag Antikörper analysiert.

#### 4.6.3 Bindung der T2/1- und T2/6-Fc an Lipoteichonsäure

Aufgrund des Mangels an markierten Liganden für den TLR2/TLR1 bzw. TLR2/TLR6-Komplex, wurde für die Überprüfung der Bindung an T2/1- und T2/6-Fc auf einen Bindungs-ELISA zurückgegriffen. Hierfür wurde LTA auf eine hochbindende ELISA-Platte fixiert und anschließend mit Überständen aus T2/1-, T2/6- oder LPS-Trap-Fc (Kontrolle) produzierenden HEK293T inkubiert. Gebundene Fusionsproteine wurden mit einem Anti-hIgG-Fc Antikörper detektiert. Nur die TLR2-Fusionsproteine zeigten eine robuste Bindung an LTA, während die LPS-Trap-Fc erwartungsgemäß nicht mit LTA interagierte (Abb. 4.49).



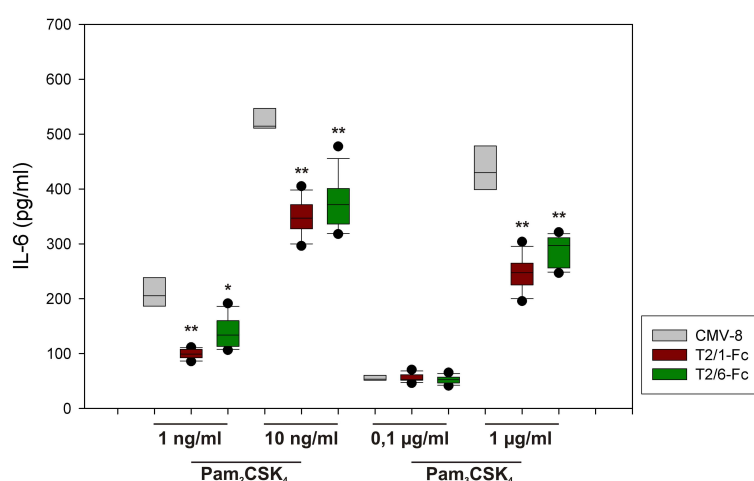
**Abb. 4.49: Bindung der T2/1- und T2/6-Fc an Lipoteichonsäure**

ELISA-Platten wurden über Nacht mit LTA beschichtet und anschließend mit serumhaltigen Überständen von T2/1- (rot), T2/6- (grün) oder LPS-Trap-Fc (grau) transfizierten HEK293T-Zellen inkubiert. Die Detektion der gebundenen Fusionsproteine erfolgte mittels eines Anti-hIgG Antikörpers, anschließender chromogener Reaktion und Vermessung im ELISA-Reader bei den Wellenlänge 450-540nm. \*  $p < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test,  $n=16$

#### 4.6.4 T2/1- und T2/6-Fc hemmen die Lipopeptid stimulierte Zellaktivierung

Im nächsten Schritt sollte die biologische Aktivität der TLR2-Fusionsproteine im Zellmodell untersucht werden. Hierfür wurden HEK293T-Zellen entweder mit p3xFlag-CMV-8 alleine oder mit TLR2-Fusionsprotein-haltigen Expressionsvektoren transfiziert und 48 h mit MM6-Zellen in Transwells kokultiviert. Die Stimulation erfolgte entweder mit dem diacylierten Lipopeptid Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> (1 und 10 ng/ml, TLR2/6-Ligand) oder dem triacylierten Lipopeptid Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (0,1 und 1 µg/ml, TLR2/1-Ligand). Nach 16 h wurden die IL-6 Konzentrationen in den Überständen per ELISA gemessen.

In Anwesenheit von T2/1- und T2/6-Fc zeigte sich eine signifikant niedrigere Lipopeptid-induzierte IL6-Sekretion als in kontrolltransfizierten Überständen (Abb. 4.50). Die Stimulation mit 0,1 µg/ml Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> führte zu keinem messbaren IL-6 Anstieg im Überstand gegenüber der Kontrolle. Überraschenderweise konnten die TLR2-Fusionsproteine die Effekte der Lipopeptide unabhängig von ihrem Acylierungsgrad hemmen. Dies könnte bedeuten, dass der TLR2-Teil alleine für die Hemmung verantwortlich war und die jeweiligen nativen, biologisch aktiven TLR-Heterodimere von dem Fusionsprotein nicht gebildet wurden. Die TLR2-Fusionsproteine besaßen aber trotzdem grundsätzlich das Potential, eine Lipopeptid-induzierte proinflammatorische Reaktion *in vitro* zu hemmen.



**Abb. 4.50: Biologische Aktivität der T2/1- und T2/6-Fc im Transwell-Modell**

T2/1- (rot), T2/6- (grün) oder kontrolltransfizierte (grau) HEK293T wurden mit MM6-Zellen in Transwells 48 h kokultiviert. Die Stimulation erfolgte mit 1 und 10 ng/ml Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> bzw. 0,1 und 1 µg/ml Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> über Nacht. Die IL-6 Konzentrationen im Überstand wurden anschließend mittels ELISA vermessen. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , Mann-Whitney-U-Test,  $n=4$  (Kontrolle),  $n=8$  (T2/1- und T2/6-Fc)



## 5 Diskussion

### 5.1 Modulation der TLR-Signaltransduktion auf Rezeptorebene

Seit es Richard Pfeiffer 1892 gelang, mit hitzestabilen Fragmenten aus *Vibrio cholerae* einen septischen Schock in Meerschweinchen auszulösen, wurde intensiv nach der aktiven Komponente dieses Endotoxins, das später als LPS identifiziert wurde, und seinem Rezeptor gesucht. Erst über 100 Jahre später konnte TLR4 als Rezeptor für LPS ermittelt werden [21]. Der Einfluss von LPS und damit TLR4 auf den Pathomechanismus der Sepsis ist heute unbestritten. So lösen im Menschen kleinste Mengen an LPS klinische Symptome einer Sepsis aus [153] und TLR4 mutante oder defiziente Mäuse sind resistent gegen einen LPS-induzierten Endotoxinschock [21; 154]. So wurden in der Vergangenheit große Anstrengungen unternommen, die Effekte von LPS zu antagonisieren. Spätestens in klinischen Studien zeigte sich aber die Wirkungslosigkeit dieser Substanzen (siehe 1.6.1). Ein Grund für das Scheitern dieser Strategien könnte die Fixierung auf mikrobielle Komponenten sein, deren Antagonisierung nur in der Frühphase einer Sepsis sinnvoll erscheint. Oft können aus Sepsispatienten keine positiven Kulturen isoliert werden, was dafür spricht, dass die Entzündungsreaktion von endogenen Liganden weitergetragen wird [155]. Ferner erscheint die komplette Blockade von TLRs als ein zweischneidiges Schwert. So sind die endotoxinresistenten TLR4-mutanten oder -defizienten Mäuse höchst anfällig für *Salmonella typhimurium*-Infektionen [156]. Im Verlauf einer Sepsis folgt einer Hyperaktivierung des Immunsystems mit hohen Serumspiegeln an proinflammatorischen Mediatoren eine Phase der Immunparalyse, die sich durch erhöhte Reinfektionsgefahr auszeichnet [94; 157]. Durch Kontrolle der TLR-Signaltransduktion über lösliche Rezeptoren könnten die genannten Limitationen der bisherigen Behandlungsstrategien umgangen werden: Zum einen würden lösliche Rezeptoren auch die Effekte von Spätmediatoren der Entzündung, die über TLRs wirken, hemmen. Auf der anderen Seite könnte über die kompetitive Hemmung eine kontrollierte Regulation der TLR-Signalkaskaden erreicht werden. Die Charakteristika der untersuchten löslichen TLR4 und TLR2-Fusionsproteine werden im Folgenden näher diskutiert.

## 5.2 Beeinflussung der TLR4-Signaltransduktion durch die LPS-Trap-Fc

Der Austausch des C-terminalen-His-Markerpeptids durch ein humanes IgG-Fc-Fragment sollte die Eigenschaften des TLR4/MD-2 Fusionsproteins um folgende Punkte verbessern [158]: (1) Erhöhung der Avidität zum Liganden; (2) erleichterte Isolierung aus Zellüberständen über Protein A oder G-Affinitätschromatographie; (3) verlängerte Halbwertszeit *in vivo* und (4) Aktivierung von Effektorzellen durch die Fc-Region. Zunächst sollte ein Zellsystem gefunden werden, das die LPS-Trap-Fc in aktiver Form und in hohen Ausbeuten produziert. Die Produktion in einem modifizierten *Drosophila* S2- und im pIRES-Expressionssystem brachte trotz großer Reinheit nach der Isolierung zu geringe Ausbeuten für den Einsatz im Tierexperiment. Von der Herstellung in einem prokaryotischen System wurde trotz sehr hoher Ausbeuten aus mehreren Gründen abgesehen. So werden Proteine von Bakterien im Allgemeinen nicht glykosyliert. N-Glykosylierungen von TLR4 und MD-2 scheinen aber von entscheidender Bedeutung für ihre Funktionalität zu sein [159]. Ferner sind rekombinante Proteine aus prokaryontischen Systemen häufig aufgrund von Fehlfaltungen weder löslich noch funktionell aktiv. Ein weiteres großes Problem wäre die hohe Endotoxinbelastung von *E. coli* produzierter LPS-Trap-Fc. Im Baculovirus-Expressionssystem konnte das Protein schließlich in hohen Mengen und großer Reinheit produziert werden. Gegenwärtig wird zur Vereinfachung der Produktion ein Insektenzellsystem erprobt, das im Gegensatz zu den S2-Zellen die Isolierung und die Auslese einzelner Klone erlaubt.

Trotz unterschiedlicher Glykosylierungsmuster besaßen sowohl die in Insekten- als auch im Säugersystem produzierte native LPS-Trap-Fc die Fähigkeit, LPS zu binden und den TLR4/MD-2 Komplex zu formen. Die native LPS-Trap-Fc konnte die Effekte von LPS in einem Transwell-Modell in Analogie zur LPS-Trap-His [160] oder rekombinanten TLR4 und MD-2 [161] hemmen. Gereinigte LPS-Trap-Fc hingegen entwickelte aufgrund von Oligomerenbildung keine LPS-Bindungsfähigkeit und infolgedessen auch keine biologische Aktivität gegen LPS. Derartige Oligomerisierungsphänomene traten auch bei der LPS-Trap-His auf und konnten durch Mutationen des cysteinreichen MD-2 nicht verhindert werden [120]. Damit handelte es sich bei der Oligomerisierung um Aufreinigungsartefakte, die allerdings im Gegensatz zur LPS-Trap-His bei der LPS-Trap-Fc nicht durch eine Isolierung über eine Säulenchromatographie verhindert werden konnten [120].

Im Gegensatz zu Chelatierender Sepharose werden die Fusionsproteine aus Protein G im sauren Milieu eluiert. Deshalb wurden alternative Reinigungsmethoden, die im neutralen oder leicht basischen Milieu durchgeführt werden können, getestet. Die Isolierung der mit einem zusätzlichen 6xHis-Peptid versehenen His-LPS-Trap-Fc über Chelatierende Sepharose oder einer Anionenaustauschersäule führte zum Erhalt der LPS-Bindungsfähigkeit. Diese alternativen Reinigungsmethoden bedeuteten aber einen gewaltigen Rückschritt in Bezug auf die Reinheit der Proteinfractionen.

### 5.3 Untersuchung weiterer Liganden für die LPS-Trap

Das immunmodulierende Prinzip der LPS-Trap liegt nicht nur in der kompetitiven Hemmung von LPS, sondern auch in der Bindung weiterer, zum Teil auch noch weiterer unbekannter Mediatoren. Da bisher eine große Vielfalt von Liganden v.a. für TLR2 und TLR4 beschrieben worden ist [107-109], spricht man von einer Promiskuität dieser Rezeptoren. Da viele dieser postulierten Liganden völlig unterschiedliche Strukturmerkmale aufweisen und Kontaminationen nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten, ist ihre direkte Bindung an den jeweiligen TLRs umstritten [39; 162]. Mit der LPS-Trap konnte die direkte Bindung einiger postulierter Liganden überprüft werden.

Der antitumorale Naturstoff Paclitaxel aus *Taxus brevifolia* ähnelt in seiner Wirkung den Effekten von Endotoxinen. So erhöht die Behandlung von Mausmakrophagen mit Taxol die TNF-Rezeptordichte und löst die Ausschüttung von TNF aus, während diese Effekte in C3H/HeJ-Makrophagen ausblieben [163]. Der TLR4/MD-2 Rezeptorkomplex ist für diese Effekte, die im Maus-, nicht aber im humanen System auftreten, verantwortlich [119]. In Bindungsexperimenten mit der LPS-Trap konnte zum ersten Mal die direkte Interaktion von Paclitaxel mit dem TLR4/MD-2-Rezeptorkomplex gezeigt werden. Bisher konnte lediglich die Bindung von sMD-2 an Paclitaxel nachgewiesen werden [129]. Über den Mechanismus der Bindung existieren bisher nur Hypothesen, die hydrophobe Bindungshöhle von MD-2 ist aber grundsätzlich in der Lage, Paclitaxel aufzunehmen [129]. Da sowohl humanes als auch Maus-MD-2 mit Paclitaxel interagieren [129], dürfte das Taxan nur in Maus-MD-2 eine Konformationsänderung induzieren, die wiederum durch Heterotetramerisierung von TLR4/MD-2 die Signalkaskade aktiviert. Weiterhin war die LPS-Trap-Fc in der Lage, eine Paclitaxel induzierte proinflammatorische Reaktion

von RAW264.7-Zellen hemmen. Diese Erkenntnisse stützen die Annahme, dass das Fusionsprotein die natürliche Konformation des TLR4/MD-2 Rezeptorkomplexes bildet und eine kompetitive Hemmwirkung gegenüber membranständigen Rezeptoren entwickelt.

Während der Isolierung von rekombinanten Adenoviren über adsorbierende Membranen konnte festgestellt werden, dass nur etwa 10% des Titers an Ad-LPS-Trap-Fc im Vergleich zu Ad- $\beta$ -Gal gewonnen werden konnten. Daher wurde der Frage nachgegangen, ob die LPS-Trap-Fc(Ad), die reichlich im Überstand Ad-LPS-Trap-Fc infizierter Zellen vorlag, die Adenoviren für die Adsorption maskierte. Proteine des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) [131] und des Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) [130] aktivieren spezifisch TLR4-Signalwege. Ferner konnten Hüllproteine des Maus-Mammatumortumor-Virus (MMTV) mit TLR4 aus Zelllysaten koimmunpräzipitiert werden [132]. Die Aktivierung von TLR4 durch Viren erscheint konsequent, da durch den TRIF-Signalweg auch eine starke antivirale Immunantwort induziert wird [131]. In Koimmunpräzipitationsexperimenten mit Ad- $\beta$ -Gal und gereinigter LPS-Trap-His konnte jedoch überraschenderweise keine direkte Interaktion zwischen Virus und Fusionsprotein beobachtet werden. Es besteht dennoch die Möglichkeit, dass durch die LPS-Trap-Fc die Membran direkt maskiert wurde. Da der Aufbau und Zusammensetzung der Membran vom Hersteller geschützt sind, konnten keine weiteren Erkenntnisse über das beobachtete Phänomen gewonnen werden.

Die Interaktion der LPS-Trap mit Entzündungsmediatoren der Sepsis sollte das postulierte Wirkprinzip des Fusionsproteins bestätigen. HMGB1 wurde ursprünglich als DNA-bindendes Protein, das zur Stabilität von Nukleosomen und zur Transkription beiträgt, beschrieben. Darüber hinaus wird es aber auch von Monozyten und Makrophagen nach der Stimulation mit LPS, TNF oder IL-1 sezerniert und von nekrotischen Zellen freigesetzt [133; 164]. Über *fluorescence resonance energy transfer* (FRET)-Analyse konnte lediglich die hohe räumliche Nähe von TLR4 mit und HMGB1 gezeigt werden [136]. Über die Immunpräzipitation von humanem HMGB1 durch gereinigte LPS-Trap-His war es möglich, die direkte Interaktion von Ligand und Rezeptor nachzuweisen. Die Immunpräzipitation von HMGB1 durch TLR4 aus Zelllysaten TLR4-transfizierter HeLa-Zellen bestätigt diese Ergebnisse [165]. Die Assoziation von HMGB1 mit TLR4/MD-2 scheint aber deutlich

geringer als die von LPS. So konnte LPS (~15,8 kDa) bereits in zweifachem molaren Überschuss HMGB1 (31 kDa) aus seiner Bindung vollständig verdrängen.

HMGB1 spielt als Gefahrensignal eine gewichtige Rolle in der Pathogenese einer Sepsis. So erhöhen sich HMGB1-Spiegel im Serum erst 24 h nach der Verabreichung von LPS. Weiterhin konnte ein Endotoxinschock von Mäusen durch die Gabe eines Anti-HMGB1-Antikörpers 2 h nach der Injektion einer tödlichen Dosis LPS verhindert werden [133]. Sepsis-Patienten weisen erhöhte HMGB1-Serumspiegel auf, die mit der Sterberate korrelieren [93]. Die Bindung dieses Spätmediators der Entzündung bestätigt damit das postulierte Konzept und das breitere Wirkprofil der LPS-Trap im Vergleich zu spezifischen Antikörpern gegen Entzündungsmediatoren.

In einem weiteren Ansatzpunkt konnte die LPS-Trap für die Untersuchung der Bindung freier Fettsäuren genutzt werden. Diabetes ist charakterisiert durch Adipositas, Insulinresistenz und einem Zustand chronischer Entzündung. TLR4 scheint eine zentrale Rolle in der Verbindung von Entzündung und Diabetes zu spielen [166]. So lösen gesättigte Fettsäuren in Makrophagen die TLR4-Signalkaskade aus, während mehrfach ungesättigte Fettsäuren eine hemmende Wirkung besitzen [167]. Freie Fettsäuren führen auch in Adipozyten über TLR4 zu einer Entzündungsreaktion [139; 140]. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Lipid A-Fettsäuren wurde eine direkte Aktivierung von TLR4/MD-2 durch freie Fettsäuren postuliert [168]. Weder in Bindungsassays mit <sup>14</sup>C-markierten Fettsäuren noch in Verdrängungsexperimenten über Immunpräzipitation oder ELISA konnte eine robuste Bindung der untersuchten Fettsäuren beobachtet werden. Dies bestätigte sich auch für die im Lipid A von *E. coli* natürlich vorkommenden Lauryl- und Myristinsäuren. Eine lediglich schwache Hemmung der LPS-Bindung konnte durch die mehrfach ungesättigten Eicosapentaen- und Linolsäure im 1000-fach molaren Überschuss festgestellt werden. Im Falle der Linolsäure erreichte diese Verdrängung statistische Signifikanz. Eine direkte Auslösung der Signalkaskade von TLR4 durch freie Fettsäuren über MD-2 erscheint durch das Fehlen eines definierten und für die Aktivierung von TLR4 unerlässlichen Protein- oder Zuckerrückgrats [31; 37], zwar unwahrscheinlich, es kann aber durch die Verdrängungsexperimente nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass freie Fettsäuren mit niedriger Avidität tatsächlich an TLR4/MD-2 binden und dadurch die Signalkaskade initiieren. Für eine physiologische Wirkung wäre dies vollkommen ausreichend, da lokal sehr hohe

Fettsäurekonzentrationen erreicht werden können, während das für TLR4 hochaffine LPS nur in geringsten Mengen im Falle einer Infektion im Organismus auftritt. Des Weiteren könnten Fettsäuren unabhängig von der Interaktion von LPS mit TLR4/MD-2 in Analogie zu TLR2 an andere hydrophobe Domänen von TLR4 binden.

#### 5.4 TLR4/MD-2-hIgG-Fc als Opsonin für Gram-negative Bakterien

Durch den Austausch des C-terminalen 6xHis-Markerpeptids mit einem humanen IgG-Fc Fragment erlangen die TLR4/MD-2-Fusionsproteine Antikörper-ähnliche Eigenschaften. Antikörper können als bifunktionelle Moleküle betrachtet werden: Mit ihren variablen Domänen binden Antikörper an ihr Antigen, während der Fc-Teil für die Effektorfunktionen verantwortlich ist. Das Antigen wird so einerseits in seiner Wirkung neutralisiert, andererseits für das Immunsystem sichtbar gemacht. Diesen Vorgang bezeichnet man als Opsonisierung. Die Fc-Region vermittelt zwei Hauptmechanismen für die Elimination von Pathogenen. Die Bindung an Fc-Rezeptoren führt zur Phagozytose und Eliminierung des Antigens durch Makrophagen oder neutrophile Granulozyten und zur Lyse durch NK-Zellen. Des Weiteren wird durch das Fc-Fragment der klassische Weg der Komplementkaskade aktiviert, was erhöhte Opsonisierung und schließlich die Lyse des Pathogens zur Folge hat.

Da die Effektorfunktionen des Fc-Teils isotypspezifisch sind, wurden zusätzlich Fusionsproteine mit C-terminalen humanen IgG2-, IgG3- und IgG4-Fc konstruiert. Diese konnten erwartungsgemäß wie die IgG1-Variante als lösliche Proteine von HEK293T-Zellen produziert werden und besaßen die Fähigkeit LPS zu binden und zu neutralisieren.

Eine Grundvoraussetzung für eine effektive Auslösung von Effektorfunktionen ist die Assoziation der LPS-Trap-Fc an Pathogene. Aufgrund der hohen LPS-Konzentration in der Umgebung Gram-negativer Bakterien wurde postuliert, dass die LPS-Trap an bakterielle Oberflächen binden könnte. Diese Hypothese bestätigte sich durch den Nachweis der Bindung von gereinigter LPS-Trap-His an *E. coli*. Diese Bindung zeigte eine Dosisabhängigkeit und konnte durch die Vorinkubation des Fusionsproteins mit LPS neutralisiert werden. Somit schien die Bindungstasche von MD-2 für die Interaktion mit der bakteriellen Oberfläche verantwortlich. Mit LPS-Trap-Fc1-haltigen Überständen konnte die Bindung sowohl über eine FACS-Analyse mit hitzeinaktivierten *E. coli* als auch an lebenden Bakterien in einem „bakteriellen



ELISA“ bestätigt werden. Erstaunlicherweise zeigte die LPS-Trap-Fc die beste Bindung an *S. aureus*, der als Gram-positiver Stamm über kein LPS in der Zellwand verfügt. Dieses Ergebnis ist durch die besondere Oberflächenstruktur von *S. aureus* erklärbar: Eine Reihe von Oberflächenmolekülen ist in der Zellwand von *S. aureus* verankert, unter anderem das Protein A [169]. Dieses Protein besitzt fünf IgG bindende Domänen und interagiert mit der Fc-Region von Antikörpern [170]. Durch diese „seitenverkehrte“ Bindung wird die Opsonisierung des Bakteriums verhindert. Die starke Bindung an *S. aureus* kann folglich als eine Kontrolle für eine Bindung mit hoher Affinität betrachtet werden. Daher scheint es nicht überraschend, dass die Affinität der LPS-Trap-Fc zu *E. coli* geringer ausfällt. Ein weiterer Gram-positiver Stamm, *B. subtilis*, zeigte keine Assoziation mit der LPS-Trap-Fc. Im bakteriellen ELISA konnte darüber hinaus auch eine Sättigung der Bindung erreicht werden. Die LPS-Trap bindet folglich dosisabhängig und spezifisch über MD-2 an Gram-negative Bakterien. Diese Resultate stehen im Einklang mit zwei veröffentlichten Untersuchungen über die Opsonisierungseigenschaften von löslichem MD-2 [171; 172]. Tissières *et al* konnten zeigen, dass rekombinantes humanes MD-2 dosisabhängig an *E. coli*, aber nicht an *B. subtilis* bindet. Jain *et al* konnten nachweisen, dass rekombinant hergestelltes und lösliches MD-2 aus humanem Serum mit *Yersinia pestis* und *Neisseria meningitis* interagiert. Eine Assoziation mit dem unverkapselten Gram-positiven Stamm *Streptococcus agalactiae* und einer LPS-negativen Mutante von *Neisseria meningitis* blieb hingegen aus. LPS scheint also der entscheidende Faktor für die Bindung von MD-2 zu sein. Darüber hinaus konnte bakteriell gebundenes MD-2 über lösliches TLR4-Fc detektiert werden [172]. Demzufolge werden die für die Bindung von TLR4 kritischen Regionen von MD-2 durch die Assoziation mit der bakteriellen Oberfläche nicht maskiert.

Trotz des mehrfachen Nachweises einer Bindung von MD-2 an Gram-negative Bakterien über LPS, bleibt der Mechanismus dieser Interaktion unklar. LPS bildet einen integralen Teil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien. Der Lipid A-Rest von LPS dient als hydrophober Anker und bildet zusammen mit Phospholipiden eine Lipiddoppelschicht [173]. In einer intakten Zellwand ragt somit nur der Polysaccharidanteil aus dem Bakterium heraus, während das bioaktive Lipid A für seinen Bindungspartner MD-2 maskiert bleibt. Da für die Bindung von LPS vier der normalerweise sechs Acylketten ausreichend sind [31; 37], argumentieren Jain *et al*, dass MD-2 nur einen Teil der Acylketten bindet, während die zwei verbleibenden



die Verankerung in der Zellwand aufrechterhalten [172]. Dies erscheint bei genauerer Betrachtung zumindest bei lebendigen Bakterien mit intakter Membran allein aus sterischen Gründen unwahrscheinlich. Außerdem würden die Acylketten durch die großen Kohlenhydratreste der Kern-Oligosaccharide und des O-Antigens sterisch maskiert werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass dissoziiertes LPS von lysierten Bakterien über seine Zuckerketten mit der Polysaccharidhülle von lebendigen Bakterien assoziiert und so der LPS-Trap die Lipid A-Region präsentiert.

Der Nachweis einer tatsächlichen Opsonisierungsfunktion der LPS-Traps-Fc1-4 stellte den nächsten logischen Schritt der Untersuchungen dar. Phagozyten werden vor allem durch IgG1 und IgG3-Antikörper, die an spezifischen Fcγ-Rezeptoren (Fcγ R) binden, aktiviert. Auf Makrophagen und Neutrophilen sind unter anderem der hochaffine Fcγ RI (CD64) und der niedrigaffine Fcγ RII (CD32) auf der Zelloberfläche präsent. Die Bindung an Fcγ R löst vielfältige Effekte in Phagozyten zur Beseitigung von Pathogenen aus. Um unspezifische Entzündungsreaktionen und Gewebsschäden zu vermeiden, ist eine Differenzierung zwischen den Pathogen-gebundenen und unzähligen freien Antikörpern unerlässlich. Die Rezeptoren werden daher nur durch aggregierte oder multimerisierte Antikörper-Antigen-Komplexe aktiviert, die zu einer Vernetzung der Fcγ R führen [145]. Mit der nachgewiesenen Bindung der LPS-Trap-Fc an Gram-negative Bakterien konnte daher nicht automatisch auf Vermittlung von biologischen Effekten durch die Fc-Region geschlossen werden.

Die LPS-Trap-Fc1 zeigte gegenüber unspezifischen IgGs im zeitlichen Verlauf eine deutliche Erhöhung der Phagozytoseaktivität von opsonierten, fluoreszenten *E. coli*-Partikeln. Die Konzentration in Zellüberständen war daher ausreichend, um auf den Partikeln LPS-Trap-Fc-Aggregate zu formieren. Die Effekte erreichten bereits nach 20 min ihren Höhepunkt, während die Phagozytoserate unspezifisch opsonisierter Partikel selbst nach 60 min unter dem Niveau von LPS-Trap-Fc1 opsonisierten Partikeln blieb. Eine Opsonisierung mit LPS-Trap-Fc1 führte demnach zu einer schnelleren und effektiveren Phagozytose.

Im Vergleich der LPS-Trap-Fc1-4 und der LPS-Trap-His bestätigte sich die Isotypspezifität der Phagozytosemodulation basierend auf der Affinität zu den Fcγ R (IgG1>IgG3>>IgG4>IgG2, [143]). Die LPS-Trap-Fc 1 gefolgt von der LPS-Trap-Fc3 erhöhten die Phagozytoserate am stärksten, während LPS-Trap-Fc4 und LPS-Trap-Fc2 opsonisierte Partikel vergleichbar zu den Kontrollen phagozytiert wurden. Die

LPS-Trap-His führte trotz einer effektiven Bindung an Bakterien wie erwartet zu keiner Modulation der Phagozytoseaktivität. Dies korreliert mit den Untersuchungen von Jain *et al*, die nachweisen konnten, dass die erhöhte Phagozytoseaktivität von MD-2 opsonisierten Bakterien auf der Aktivierung der TLR4-Signalkaskade beruht [172].

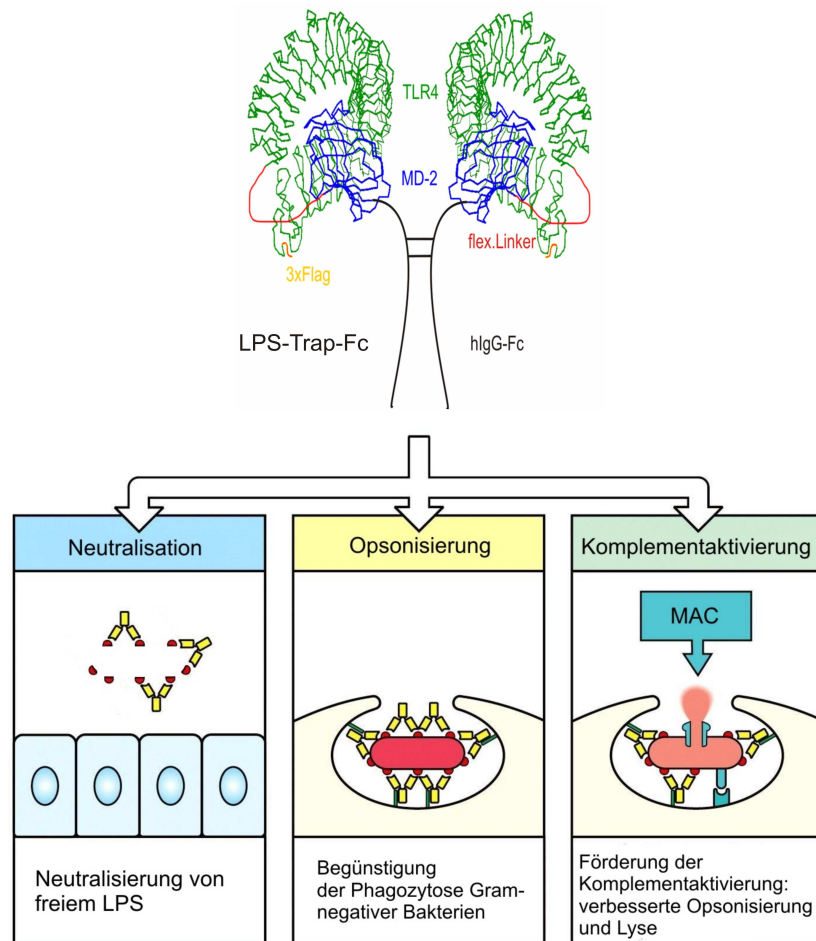
Der klassische Weg des Komplementsystems wird zum Schutz des gesunden Organismus ebenfalls nur durch Antigen-Antikörper-Komplexe ausgelöst. Die Aktivierung der ersten Komponente C1q erfolgt nur, wenn mindestens zwei IgG-Moleküle maximal 30 bis 40 nm voneinander entfernt sind [149]. In einem Komplementaktivierungsassay zeigte sich, dass LPS-Trap-Fc1 und -Fc3 opsonisierte Bakterien in einem höheren Maße von Komplement lysiert werden als LPS-Trap-Fc2, -Fc3 und -His behandelte Bakterien. Damit konnte auch die Wirkung der LPS-Trap-Fc Opsonisierung auf lebendige Bakterien gezeigt werden. Einen direkten Einfluss der Fusionsproteine auf das Wachstum von Gram-negativen Bakterien konnte zuvor bereits ausgeschlossen werden.

Neben den Oberflächen-gebundenen LPS-Trap-Fc Multimeren könnten eventuell auch gelöste LPS-Trap-Fc Aggregate eine zusätzliche Effektorfunktion über die Fc-Region auslösen. Ebenfalls nicht geklärt ist wie sich gelöste, singuläre LPS-beladene LPS-Trap-Fc Moleküle verhalten. So binden lösliche CD4-hIgG1-Fc Fusionsproteine mit ebenso hoher Affinität an Fc $\gamma$  R wie humanes IgG1 [158]. Monomere IgGs werden durch Fc $\gamma$  R zwar gebunden und internalisiert, aber nicht weiter prozessiert. Die Rezeptor-IgG Komplexe rezirkulieren anschließend relativ schnell wieder an die Zelloberfläche [174].

Insgesamt bleibt die Frage, ob aktivierende Effekte auf Komplement und Phagozytose im Fall einer Sepsis überhaupt wünschenswert wären. Einerseits könnte dies zu einer schnelleren Beseitigung der bakteriellen Infektionsherde führen. Die Polysaccharidkapsel Gram-negativer Bakterien schützt diese vor Phagozytose und Komplement-vermittelter Lyse [175]. Dieser Schutz wird erst in der adaptiven Phase der Immunantwort nach frühestens drei Tagen durch Kapsel-spezifische Antikörper überwunden. Die LPS-Trap-Fc könnte diese „Opsonisierungslücke“ zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort schließen. Andererseits führt die erhöhte Aktivierung von Komplement und Phagozyten zu einer erhöhten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies,

die eine weitere Intensivierung der Entzündungsreaktion bewirken könnten. In einem solchen Fall müssten die inaktiven LPS-Trap-Fc2 oder –Fc4 eingesetzt werden.

Die Fc-Fusionsproteine besitzen somit zumindest *in vitro* eine multimodale Funktion. So wird lösliches LPS aus lysierten Bakterien neutralisiert, Gram-negative Bakterien opsoniert und ihre Phagozytose vermittelt und durch die Komplementaktivierung die Bakterien direkt eliminiert (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1: Multimodale Funktion der LPS-Trap-Fc**

## 5.5 Modifizierung der LPS-Trap-Fc

Durch die Modifizierung der LPS-Trap-Fc sollten sowohl die bescheidenen Proteinausbeuten erhöht, als auch die Wirkung des Fusionsproteins optimiert werden. Die LPS-Trap-Fc bot hierfür zwei Ansatzpunkte. Der erste Punkt umfasste die Reduzierung der LPS-Trap-Fc auf ihre pharmakologisch notwendigen Bestandteile. Die Möglichkeit der Verkleinerung von MD-2 wurde verworfen, da für die effektive Bindung von LPS entscheidende Aminosäuren über die gesamte

Sequenz verteilt sind [150]. Über Koimmunpräzipitationsexperimente wurde nachgewiesen, dass die N-terminale Region von TLR4 ebenfalls unverzichtbar für die Assoziation mit MD-2 ist [35; 151], während über TLR4-Mutanten mit gekürzten C-Termini ( $\Delta$  AS 321-637) noch MD-2 koimmunpräzipitiert werden konnte [35]. Dementsprechend wurden mit der LPS-Trap-FcM ( $\Delta$  AS 410-627) und LPS-Trap-FcS ( $\Delta$  AS 350-627) zwei am C-Terminus verkürzte Varianten des Fusionsproteins generiert. Die verkürzten Varianten konnten in löslicher Form in Zellüberstände sezerniert werden und besaßen die Fähigkeit, LPS zu binden. Im Gegensatz zur LPS-Trap-Fc konnte die LPS-Bindung aber nicht durch einen TLR4/MD-2-Antikörper neutralisiert werden. Folglich wurde der native TLR4/MD-2 Komplex nicht gebildet. Die LPS-Bindung war erwartungsgemäß nicht stabil genug, um einen Hemmeffekt gegenüber membranständigen TLR4/MD-2 im Transwell-Modell zu erreichen. Dies lässt den Schluss zu, dass die demonstrierte Bindung von LPS ausschließlich über MD-2 ( $K_D=65$  nM [32]) erfolgte und nicht über den TLR4/MD-2 Komplex ( $K_D=3-10$  nM [176; 177]) stabilisiert wurde. Die schwächere Bindung von LPS durch die verkürzten Fusionsproteine im Vergleich zur LPS-Trap-Fc in einem Bindungsassay unterstrich diese Schlussfolgerung.

Der extrazelluläre Teil von TLR4 kann in eine N-terminale, Zentral- und C-terminale LRR-Domäne eingeteilt werden. Im Kristallstrukturmodell konnte die Annahme bestätigt werden, dass MD-2 im Bereich der N-terminalen und Zentraldomäne mit TLR4 wechselwirkt [37]. Da beide verkürzten Varianten noch über die komplette N-terminale und Zentral-LRR-Domäne verfügten, wäre zu erwarten, dass sich der TLR4/MD-2 Komplex bildet. Die schlechten Bindungseigenschaften können daher nur durch den Verlust des LRRCT (*leucine rich repeat C-terminal*, AS 580-629)-Moduls erklärt werden. Alle natürlichen LRR-Proteine verfügen an ihren jeweiligen Enden über zwei cysteinreiche spezialisierte Module, LRRNT und LRRCT. Diese bedecken den hydrophoben Kern der restlichen LRR-Module und stellen unersetzbare strukturelle Bestandteile dar [37; 178], deren Verlust zu Einschränkungen in der Funktionalität führt. Da Verkürzungen der LPS-Trap-Fc darüber hinaus noch Effekte auf weitere Liganden für TLR4 besitzen könnten, wurde von weiteren Modifikationen abgesehen, um das Wirkprofil nicht einzuschränken.

In einem zweiten Ansatz zur Modifikation wurde versucht, über die Verlängerung des Linkers einen verbesserten TLR4/MD-2 Komplex zu schaffen. Der Polypeptid-Linker der LPS-Trap wurde willkürlich gewählt und bereits für andere

Fusionsproteine erfolgreich verwendet [179]. Eine Verlängerung des Linkers um 15 AS (LPS-Trap-Fc(30AS)) brachte trotz der relativ großen Entfernung des MD-2 N-Terminus vom TLR4 C-Terminus [37] nur eine schwache Steigerung der LPS-Bindung. Weiterhin scheinen die IgG-Fc-Domänen keinen störenden Einfluss auf den TLR4/MD-2 Komplex auszuüben, da der Einbau eines 15 AS-Polypeptid Linkers (LPS-Trap-L-Fc) zu keiner signifikanten Verbesserung der LPS-Bindung führte. Eine schwache Steigerung der LPS-Bindungsaffinität konnte mit der LPS-Trap-L-Fc(30AS) erreicht werden; es bleibt aber zu überprüfen, ob diese Effekte Einfluss in biologischen Modellen besitzen.

Das verwendete Polypeptid besteht hauptsächlich aus der Aminosäure Glycin, die aufgrund fehlender Reste dem Linker größtmögliche Flexibilität verleiht und so die Bildung des TLR4/MD-2 Komplexes ermöglicht. Ein unflexibler Linker mit optimierter Länge, der den Komplex aus TLR4 und MD-2 durch die räumliche Annäherung „erzwingen“ würde, wäre die effektivste Lösung für das Fusionsprotein. Ein derartiges Polypeptid müsste aber zunächst mit Hilfe der inzwischen bekannten Kristallstruktur von TLR4/MD-2 [180] im Proteindesign erstellt werden.

## 5.6 Charakterisierung und Einsatz der LPS-Trap-Fc(Ad)

Die Isolierung der LPS-Trap-Fc über Protein G führte zu einem Aktivitätsverlust aufgrund von Oligomerenbildung. Durch alternative Reinigungsmethoden konnte zwar die LPS-Bindungsfähigkeit erhalten, aber nicht die notwendige Reinheit der Proteineluate erzielt werden. Daher wurde die Möglichkeit untersucht, die LPS-Trap-Fc durch ein rekombinantes Adenovirus (Ad-LPS-Trap-Fc) zu gewinnen. Durch die Produktion im eigentlichen Versuchstier konnte auf ein aufwendiges Reinigungsverfahren verzichtet werden und das Fusionsprotein in aktiver Form und ohne weitere Endotoxinkontaminationen eingesetzt werden. Die Eigenschaften der LPS-Trap-Fc(Ad) in Hinsicht auf LPS-Bindung und biologischer Aktivität deckten sich *in vitro* mit der konventionell hergestellten LPS-Trap-Fc. Um einen Einfluss der Virusinfektion auf das Versuchsmodell zu vermeiden, war zunächst beabsichtigt, die LPS-Stimulation der Versuchstiere frühestens am 7. Tag p.i. durchzuführen. Das Maximum der LPS-Trap-Fc Konzentration im Serum infizierter Mäuse wurde aber bereits am Tag 4 p.i. erreicht, danach sanken die Serumspiegel kontinuierlich. Dieser schnelle Rückgang kann auf zwei potentielle Ursachen zurückgeführt werden. Bereits am Tag 7 p.i.. konnten im Serum LPS-Trap-

Fc spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Sowohl der künstliche Linker zwischen TLR4 und MD-2 als auch die humane IgG-Fc-Region könnten als starkes Immunogen wirken. Daher wurde der Serumspiegelverlauf der LPS-Trap-Fc(Ad) in T- und B-Zell defizienten SCID-Mäusen untersucht. Überraschenderweise konnte hier bereits nach einem Tag ein Rückgang der LPS-Trap-Fc(Ad)-Serumkonzentrationen beobachtet werden. Demnach sind auch andere Effekte für den schnellen Verlust des Fusionsproteins im Serum verantwortlich. Trotz der Unfähigkeit sich zu vermehren sollten die Adenoviren länger in den Mäusen persistieren und kontinuierlich Fusionsprotein nachproduzieren. So konnten virale Vektorsequenzen bis zu einem Jahr und virale Proteinproduktion bis zu 30 Tagen in Mäusen nachgewiesen werden [181]. Der rasche Rückgang der Plasmaspiegel ist daher sowohl auf einen schnellen Abbau oder zellulären Aufnahme des Fusionsproteins als auch auf die Einstellung der viralen Proteinproduktion zurückzuführen.

Als Kompromiss wurde die LPS-Stimulation am Tag 4 p.i. in CD-1 Mäusen vorgenommen. Erstaunlicherweise zeigten Ad-LPS-Trap-Fc-infizierte Mäuse höhere TNF und MCP-1 Spiegel als kontrollinfizierte Tiere. Dies steht im Gegensatz zum erfolgreichen Einsatz der LPS-Trap-His in einem analogen Entzündungsmodell [120] und von sTLR4 und sMD-2 in einem Lungenentzündungsmodell [182]. Die Wirksamkeit eines löslichen Rezeptors basiert im Prinzip auf dem Massenwirkungsgesetz und hängt von vier Parametern ab [180], die diese widersprüchlichen Erkenntnisse erklären könnten:

1. Konzentration des Liganden: Mit 1 µg LPS (ca. 50 µg/kg) wurde relativ wenig LPS appliziert. Es ist unwahrscheinlich aber nicht ausgeschlossen, dass höhere Mengen die Wirkung der LPS-Trap-Fc erst zum Tragen bringen.
2. Konzentration des löslichen Rezeptors: Die Serumkonzentration der LPS-Trap-Fc(Ad) war im Adenovirenmodell nur schlecht reproduzierbar. Mit dem Einsatz von rekombinant hergestelltem Fusionsprotein könnte man definierte Mengen einsetzen. Aus Untersuchungen mit löslichen TNF-Rezeptoren ist bekannt, dass zu niedrige Konzentrationen von sTNF-R zu verstärkten TNF-Effekten führt [183]. Dieses Phänomen könnte auch auf die LPS-Trap-Fc zutreffen.
3. Stöchiometrie des Liganden/Rezeptor-Komplexes: Die Stöchiometrie von TLR4/MD-2 zu dem TLR4-Antagonisten Eritoran beträgt 1 zu 1 [37].



Dementsprechend dürfte die LPS-Trap-Fc zwei Moleküle LPS binden. Sollte dies z.B. aus sterischen Gründen nicht möglich sein, ergäbe sich für die LPS-Trap-Fc gegenüber der LPS-Trap-His ein deutlich schlechteres Masse/Wirkungsverhältnis. Dies hätte zur Folge, dass unverhältnismäßig große Mengen an LPS-Trap-Fc im Tierexperiment eingesetzt werden müssten.

4. Dissoziationskonstante des Liganden: Über die Affinität von LPS zur LPS-Trap-Fc im Vergleich zum natürlichen TLR4/MD-2 Komplex ist nichts bekannt. Sollte die Affinität der LPS-Trap-Fc zu LPS deutlich geringer sein, könnte das Fusionsprotein LPS den membranständigen Rezeptoren präsentieren und damit dessen Effekte verstärken.

Eine weitere Erklärung könnte die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von LPS durch die LPS-Trap-Fc *in vivo* darstellen. Diese Effekte werden für die paradoxe Wirkung von rekombinantem löslichen IL4-R verantwortlich gemacht: Während sIL-4R die IgE-Antwort in *in vitro*-Modellen hemmt, wurde diese beim Einsatz von exogenem IL-4 im Tiermodell dosisabhängig gesteigert [184]. Darüber hinaus ist über die Bioaktivität der LPS-Trap-Fc im Serum am Tag 4 p.i. nichts bekannt. Im schlechtesten Fall ist das im Serum vorhandene Fusionsprotein mit endogenen Liganden - eventuell stimuliert durch die Vireninfektion – komplett beladen und kann somit kein LPS neutralisieren. Daher sind weitere Tierexperimente mit konventionell hergestelltem Fusionsprotein in unterschiedlichen Dosen an LPS-Trap und LPS für die Klärung der genannten Punkte unerlässlich.

## 5.7 Modulation der TLR2-Signaltransduktion

Da eine LPS-Hemmung über lösliches TLR4/MD-2 im Prinzip funktioniert, wurden darüber hinaus noch Möglichkeiten der TLR2-Modulation untersucht. Als Rezeptor für bakterielle Lipopeptide besitzt TLR2 eine Schlüsselrolle sowohl in der Gram-positiven Sepsis als auch bei den häufig vorkommenden Mischinfektionen unterschiedlicher Erreger. Um das komplette Spektrum an exogenen und endogenen Liganden effektiv zu hemmen, ist in der Praxis eine Kombinationsbehandlung mit löslichen TLR2 und TLR4 angezeigt.

Die bisherige Datenlage über die Modulation der TLR2-Signaltransduktion durch lösliches TLR2 ist widersprüchlich. LeBouder *et al* konnten drei natürlich



vorkommende lösliche Varianten von TLR2 (66, 70 und 83 kDa) im menschlichen Plasma und der Muttermilch identifizieren [118]. Bei diesen Varianten handelte es sich vermutlich um die komplette extrazelluläre Domäne von TLR2, deren reine Proteinmasse von 64 auf 84 kDa mit N-Glykosylierungen anwächst [185]. Diese Polypeptide waren in der Lage die Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>-induzierte TNF und IL-8 Sekretion von MM6-Zellen signifikant zu reduzieren. Ähnliche Ergebnisse konnten mit löslichen TLR2-Fc Chimären erzielt werden, die aus der Ektodomäne von AS 1 bis 586 bestanden. Ferner reagierten PBMCs mit erhöhter IL-8 Sekretion, wenn sie in löslichem TLR2-verarmten Serum kultiviert wurden [185]. Fc-Fusionsproteine aus der extrazellulären Domäne (AS 1-563) von Maus-TLR2 (T2-Fc) zeigten überraschenderweise eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Ausschüttung von IL-6 in RAW264.7 [120]. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass lösliches TLR2-haltiger Parotisspeichel die IL-8 Produktion auf Stimulation von Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> verstärkt [186].

Da TLR2 unter anderem Heterodimere mit TLR1 und TLR6 bildet und so zwischen diacylierten und triacylierten Lipopeptiden differenzieren kann [47; 48], wurden Fusionsproteine aus den Ektodomänen von TLR2/TLR1 und TLR2/TLR6 konstruiert. Die Domänen der TLRs wurden über einen flexiblen 15 AS-Linker miteinander verbunden und über ein humanes IgG1-Fc dimerisiert (T2/1-Fc bzw. T2/6-Fc). In Säugerzellen konnten sowohl T2/1-Fc als auch T2/6-Fc als lösliche Proteine produziert und in den Überstand sezerniert werden. Beide Fusionsproteine besaßen die Fähigkeit, an LTA beschichtete ELISA-Platten zu binden, während die LPS-Trap-Fc als Kontrolle erwartungsgemäß nicht mit LTA interagierte. Demnach besitzt LTA die Fähigkeit an beide TLR2-Heterodimere zu binden, obwohl es nur über TLR2/TLR6 die Signalkaskade auslöst. Ferner könnte die Bindung beider Fusionsproteine durch Verunreinigungen mit Lipopeptiden erklärt werden, die wahrscheinlich für die Aktivität der LTA gegenüber TLR2 verantwortlich sind [39; 43].

MM6, die in T2/1- oder T2/6-Fc-haltigen Medium kultiviert wurden, zeigten nach der Stimulierung mit Lipopeptiden eine signifikant niedrigere IL-6 Sekretion als die Kontrollen. Dies korrelierte mit den Untersuchungen von LeBouder *et al.* Die widersprüchlichen Ergebnisse gegenüber sT2-Fc können folgendermaßen erklärt werden: (1) T2/1- und T2/6-Fc verfügen über ein anderes Glykosylierungsmuster als die in S2-Zellen produzierte T2-Fc. Es gibt zwar keine Untersuchungen über den Einfluss der Glykosylierung auf die Ligandenerkennung, zumindest ist aber ihre

Bedeutung für die Biosynthese und Sekretion von TLR2 bekannt [185]. (2) T2/1- und T2/6-Fc wurden in nativer Form in Überständen eingesetzt, T2-Fc hingegen über Protein A gereinigt. Die Reinigung könnte zu Oligomerbildung analog zur LPS-Trap-Fc oder anderen Störungen der natürlichen Konformation geführt haben. T2-Fc alleine stimulierte die IL-6 Sekretion zwar nur schwach [120], aber auch eine leichte Kontamination mit bakteriellen Bestandteilen könnte einen starken synergistischen Effekt zusammen mit den applizierten Lipopeptiden bewirken. (3) Für die Stimulationsversuche wurden bei *LeBouder et al* und in diesen Untersuchungen die humane monozytische Zelllinie MM6 benutzt, während in [120] die Mausmakrophagen-artige Zelllinie RAW264.7 verwendet wurde. Da eine kompetitive Hemmung immer eine Funktion von Hemmer und Rezeptor darstellt, könnte eine unterschiedliche Oberflächendichte an TLRs im Maus- und humanen System [187] diese konträren Ergebnisse erklären. (4) Lösliches TLR2 könnte durch Aggregatbildung mit membranständigen TLRs die Signaltransduktion positiv beeinflussen. Diese Aggregatbildung ist für die T2/1- und T2/6-Fc Fusionsproteine aufgrund ihrer konstitutiven Heterodimerisierung nicht mehr möglich.

Überraschenderweise hemmten T2/1-Fc und T2/6-Fc die synthetischen Lipopeptide Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> und Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> unabhängig von ihrem Acylierungsgrad. Da TLR2 mit anderen TLRs vor der Ligandenbindung nur einen losen Verband bildet [49; 50], gibt es im Gegensatz zu TLR4/MD-2 keine Antikörper gegen diesen Komplex, um dessen Bildung mit relativ einfachen Mitteln nachzuweisen. Sollten die Fusionsproteine diese losen Dimere gebildet haben, ist davon auszugehen, dass der Acylierungsgrad der Lipopeptide keinen Einfluss auf die eigentliche Bindung, sondern nur auf die Induktion eines Signalkomplexes besitzt. Im Falle, dass diese losen Dimere aufgrund sterischer Hinderung von vornherein nicht gebildet worden sind, deutet dies auf eine alleinige Hemmfunktion von TLR2 hin, das im Kristallstrukturmodell die zwei esterverknüpften Acylketten bindet [50]. Sollte dies zutreffen, müsste ein deutlicher Überfluss an Fusionsprotein gegenüber den membranständigen TLRs vorgelegen haben, da die Assoziationskonstante von TLR2/Lipopeptid vermutlich unter derjenigen des TLR2/1/Lipopeptid- und TLR2/TLR6/Lipopeptid-Komplexes liegen dürfte. Exakte Daten über die jeweiligen Bindungsstärken sind bisher nicht bekannt. Darüber hinaus kann die Selektivität von Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> für TLR2/TLR6 in Zweifel gezogen werden, da die Stimulation von B-Zellen aus TLR1-defizienten, TLR6-defizienten und WT-Mäusen mit dem diacylierten

Peptid über einen größeren Konzentrationsbereich vergleichbare Effekte hervorruft [188].

Insgesamt betrachtet verfügen TLR2 Fusionsproteine zumindest *in vitro* über das Potential, proinflammatorische Reaktionen zu hemmen. Neueste Erkenntnisse zeigen eine zentrale Rolle von TLR2 im Pathomechanismus auch der Gram-negativen Sepsis [189]. Deshalb wäre es sinnvoll, eine kombinierte TLR4/TLR2-Hemmung über lösliche Rezeptoren zu erreichen. Aufgrund der widersprüchlichen Daten über die Ligandenpalette und potentiellen Akzessorproteinen erscheint es jedoch schwierig, sich auf ein lösliches TLR-Fusionsprotein festzulegen, das universell die Signaltransduktion über TLR2 hemmt.

## 6 Zusammenfassung

Die bakterielle Sepsis ist trotz intensiver Forschung immer noch eine der Haupttodesursachen auf Intensivstationen. Im Verlauf einer Sepsis kommt es durch eine Überflutung mit mikrobiellen Produkten zu einer generalisierten Entzündungsreaktion, die sich gegen den eigenen Organismus richtet. Die Toll-like Rezeptoren (TLR) 4 als Sensor für Lipopolysaccharide (LPS) und TLR2 als Rezeptor für Lipopeptide spielen eine Schlüsselrolle in der Auslösung dieser Überreaktion. Mit der Absicht die Antwort auf das gesamte Ligandenspektrum von TLR4 und TLR2 zu modulieren, wurden lösliche TLR-Fusionsproteine konstruiert.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass sich eine LPS-induzierte Entzündungsreaktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch lösliche TLR4/myeloid differentiation-2 (MD-2)-Fusionsproteine (LPS-Trap-His) hemmen ließ. Um das Potential der LPS-Trap zu erweitern, wurde das C-terminale His-Peptid durch ein humanes IgG-Fc-Fragment (hIgG-Fc) ersetzt (LPS-Trap-Fc). Das Fc-Fragment sollte zu erleichterter Isolierung, zu längeren Serumhalbwertszeiten und zu biologischen Sekundäreffekten führen.

Die LPS-Trap-Fc war in der Lage, LPS zu binden und den für die effektive Bindung von LPS essentiellen TLR4/MD-2 Komplex zu bilden. Weiterhin konnte durch das Fusionsprotein eine LPS-induzierte proinflammatorische Reaktion in MonoMac 6-Zellen effektiv gehemmt werden. Das Potential universell TLR4-Liganden zu binden, konnte mit weiteren Liganden für TLR4 bestätigt werden. Die direkte Bindung und Hemmung von Paclitaxel bestätigte die mit membranständigem TLR4/MD2 vergleichbaren Bindungseigenschaften des Fusionsproteins. Darüberhinaus band die LPS-Trap direkt High mobility group box 1 (HMGB1), das während einer Sepsis als Spätmediator zum Entzündungsgeschehen beiträgt.

In Bindungsstudien konnte nachgewiesen werden, dass die LPS-Trap-Fc spezifisch über MD-2 an die Oberflächen Gram-negativer Bakterien bindet und somit antikörperähnliches Potential besitzt. Mit verschiedenen Isotypvarianten der LPS-Trap-Fc war es möglich, die Phagozytose von *Escherichia. coli*-Partikeln und die Komplementaktivität gegen lebende *E. coli* zu modulieren. Das IgG-Fc Fragment entwickelte folglich biologische Aktivität und führte zu Sekundäreffekten.

Die Optimierung des Fusionsproteins in Hinsicht auf Ausbeuten und Wirkung stellte ein weiteres Ziel dar. Mit den verkleinerten Varianten LPS-Trap-FcM und -FcS konnten deutlich höhere Ausbeuten erzielt werden. In weiteren Untersuchungen stellte sich aber heraus, dass die LPS-Trap-FcM und -FcS trotz nachgewiesener Bindung von LPS den TLR4/MD-2 Komplex nicht mehr bildeten und demzufolge *in vitro* keine Hemmwirkung gegen LPS entwickelten. Ferner führten Modifikationen am Linker-Polypeptid zwischen TLR4 und MD-2 zu keiner wesentlichen Verbesserung der LPS-Bindung.

Da über Protein G gereinigte LPS-Trap-Fc aufgrund von Oligomerenbildung biologisch inaktiv war, wurde für den Einsatz im Tiermodell ein LPS-Trap-Fc produzierendes Adenovirus (Ad-LPS-Trap-Fc) verwendet. Die Fusionsproteinkonzentration im Mausserum verringerte sich innerhalb kürzester Zeit ungewöhnlich schnell, was sowohl auf einen schnellen Abbau als auch eine inadäquate Produktion des Fusionsproteins hindeutete. Eine LPS-Stimulation von Ad-LPS-Trap-Fc infizierten CD-1 Mäusen führte überraschenderweise zu erhöhten Zytokinspiegeln gegenüber kontrollinfizierten Tieren. Weitere Untersuchungen mit konventionell hergestellten Fusionsproteinen sollen die widersprüchlichen *in vivo*-Daten der LPS-Trap-His und -Fc klären.

Um eine komplette Abdeckung von exogenen und endogenen Stimulatoren in Kombination mit der LPS-Trap zu erreichen, wurden TLR2/TLR1- (T2/1-Fc) und TLR2/TLR6- (T2/6-Fc) hIgG-Fc Fusionsproteine konstruiert. Durch diese sollte eine gezielte Hemmung von diacylierten (T2/6-Fc) und triacylierten (T2/1-Fc) Lipopeptiden Gram-positiver Bakterien erreicht werden. Beide Fusionsproteine waren in der Lage an LTA-beschichtete Platten zu binden. Die Hemmung einer Pam<sub>2</sub>CSK<sub>4</sub> und einer Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> stimulierten Entzündungsreaktion konnte unabhängig vom verwendeten Fusionsprotein erzielt werden. Das Prinzip der Hemmung durch lösliche Rezeptoren ist demzufolge auch auf TLR2 übertragbar.

TLR-Fusionsproteine besitzen somit das grundsätzliche Potential, proinflammatorische Reaktionen zu modulieren. Zusätzlich zur Neutralisierung von TLR4-Liganden entwickelt die LPS-Trap multifunktionale Aktivität durch die Förderung von Phagozytose und Komplementaktivierung. Die Natur der *in vivo* Wirkung muss zukünftig in weiteren Versuchen mit konventionell hergestellten Proteinen genauer charakterisiert werden.

## 7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TLR-Fusionsproteine das Potential besitzen, entzündliche Reaktionen zu modulieren. Die LPS-Trap stellt somit prinzipiell einen Ansatzpunkt für die Therapie von Infektionskrankheiten dar.

Die LPS-Trap-Fc besitzt *in vitro* vergleichbare Eigenschaften wie die bereits untersuchte LPS-Trap-His. Der Einsatz im Tiermodell zeigte aber, dass die Hemmfunktion der Fusionsproteine nicht ohne weiteres *in vivo* übertragen werden kann. In weiteren Experimenten mit durch Insektenzellen produziertem Fusionsprotein müssen unterschiedliche Dosen der LPS-Trap-Fc getestet werden, um eine endgültige Aussage über deren Hemmeffekt und die tatsächliche Serumhalbwertszeit *in vivo* zu erhalten. Versuche in einem Maus-Peritonitis-Modell, wie dem *cecal ligation and puncture* (CLP)-Modell, sind ebenfalls unerlässlich für die Beurteilung des Potentials des Fusionsproteins. In diesem Modell könnten dann auch die *in vitro* beobachteten Einflüsse der einzelnen IgG-Isotypen auf Phagozytose und Komplementaktivierung untersucht werden.

Die untersuchten Modifikationen der LPS-Trap-Fc brachten keine wesentlichen Verbesserungen der LPS-Bindung. Durch weitere Varianten v.a. des Linker-Polypeptids im Rahmen eines Proteindesign und vergleichenden Experimente in Bindungsstudien könnte ein Fusionsprotein konstruiert werden, das im besten Fall eine deutlich höhere Ligandenaffinität als membranständige Rezeptoren besitzt.

Die Hemmung von Lipopeptid-induzierten proinflammatorischen Reaktionen durch TLR2/TLR1- und TLR2/TLR6-Fusionsproteine zeigt deren grundsätzliches Potential für die Modulation einer Gram-positiven Sepsis auf. Die vom Acylierungsgrad der Lipopeptide unabgängige Wirkung der Fusionsproteine führen zu der Vermutung, dass TLR2 alleine für die biologische Aktivität verantwortlich ist. Dies kann mit löslichen TLR2-Fc Fusionsproteinen überprüft werden. Abhängig von diesen Ergebnissen müssten die neutralisierenden Effekte in einem Lipopeptid induzierten Entzündungsmodell *in vivo* geprüft werden. Bei einem positiven Ergebnis könnten die LPS-Trap und die TLR2-Fusionsproteine final gemeinsam im CLP-Modell auf ihre Wirkung untersucht werden.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

|             |  |
|-------------|--|
| Abb.        | Abbildung  |
| AcP         | Akzessorisches Protein, <i>accessory protein</i>         |
| ADCC        | antigen dependent cell cytotoxicity                      |
| Ak          | Antikörper   |
| AP-1        | <i>activator protein 1</i>                               |
| aqua bidest | zweifach destilliertes Wasser                            |
| AS          | Aminosäure   |
| ATP         | Adenosin-5'-triphosphat                                  |
| AU          | <i>arbitrary units</i>                                   |
| BODIPY      | DIPYrrromethen BOron Difluorid                           |
| bp          | Basenpaare, <i>base pairs</i>                            |
| BPI         | <i>bactericidal/permeability-increasing protein</i>      |
| BSA         | Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>          |
| CD          | <i>cluster of differentiation</i>                        |
| CDC         | <i>complement dependent cytotoxicity</i>                 |
| cDNA        | <i>copy DNA</i>  |
| CFU         | <i>Colony-forming units</i>                              |
| CMV         | Cytomegalievirus   |
| CPE         | Cytopathischer Effekt                                    |
| cpm         | <i>counts per minute</i>                                 |
| DAI         | <i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i> |
| DD          | <i>death domain</i>                                      |
| DIF         | <i>Dorsal-related immunity factor</i>                    |
| DMEM        | <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>                  |
| DNA         | Desoxyribonukleinsäure                                   |
| ds          | Doppelstrang-, <i>double-strand</i>                      |
| EDTA        | Ethylendiamintetraacetat                                 |
| ELISA       | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>                 |
| ERK         | <i>extracellular signal regulated kinase</i>             |
| EtOH        | Ethanol  |
| FCS         | Fötales Kälberserum                                      |
| FITC        | Fluoresceinisothiocyanat                                 |
| FS          | Vorwärtsstreulicht, <i>forward scatter</i>               |
| GFP         | <i>Green fluorescent protein</i>                         |
| GM-CSF      | <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>  |
| GSK3        | <i>glycogen synthase kinase 3</i>                        |
| h           | Stunde(n)  |
| HBSS        | <i>Hank's balanced salt solution</i>                     |
| HDL         | <i>high density lipoprotein</i>                          |
| HEK293T     | <i>human embryonic kidney cells</i>                      |
| hIgG-Fc     | humanes IgG-Fc Fragment                                  |
| His         | Histidin   |
| HMG-1/HMGB1 | <i>High Mobility Group Box Protein 1</i>                 |
| HRP         | Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>     |
| HSA         | humanes Serumalbumin                                     |
| IEP         | Isoelektrischer Punkt                                    |
| IFN         | Interferon   |
| Ig          | Immunglobulin  |



|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| IKK                               | <i>inhibitory κB kinase</i>  |
| IL                                | Interleukin  |
| IMD                               | <i>immune deficiency</i>   |
| IPTG                              | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid   |
| IRAK                              | <i>IL-1R-associated kinase</i>   |
| IRES                              | interne ribosomale Eintrittsstelle, internal ribosomal entry site  |
| IRF                               | <i>interferon regulatory factor</i>  |
| IκB                               | <i>inhibitory κB</i>   |
| JNK                               | <i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i>  |
| kDa                               | Kilodalton   |
| LALF                              | <i>limulus anitlipopolysaccharid factor</i>  |
| LB                                | <i>lysogeny broth</i>  |
| LBP                               | <i>Lipopolysaccharide-binding protein</i>  |
| LDL                               | <i>low density lipoprotein</i>   |
| LGP2                              | <i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>   |
| LPS                               | Lipopolysaccharid  |
| LTA                               | Lipoteichonsäure   |
| M                                 | molar, mol/l   |
| mAb                               | Monoklonaler Antikörper  |
| MAC                               | Membranangriffskomplex, <i>membrane attack complex</i>   |
| MAPK                              | <i>mitogen-activated protein kinase</i>  |
| MCP-1                             | <i>monocyte chemoattractant protein-1, = CCL2</i>  |
| MD-2                              | <i>myeloid differentiation-2</i>   |
| MDA5                              | <i>melanoma-differentiation-associated gene 5</i>  |
| mg                                | Milligramm   |
| min                               | Minute(n)  |
| ml                                | Milliliter   |
| MM6                               | Mono Mac 6   |
| MMTV                              | Maus-Mammatumortumor-Virus   |
| MOI                               | <i>multiplicity of infection</i>   |
| mRNA                              | <i>messenger Ribonucleinsäure</i>  |
| MyD88                             | <i>myeolid differentiation protein 88</i>  |
| μl                                | Mikroliter   |
| NEMO                              | <i>Nf-κB essential modifier</i>  |
| NF-κB                             | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>  |
| NK-Zelle                          | natürliche Killerzelle   |
| nm                                | Nanometer  |
| OD                                | optische Dichte  |
| p                                 | statistischer P-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)   |
| p.i.                              | <i>post infectionem</i>  |
| PAGE                              | Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| Pam <sub>2</sub> CSK <sub>4</sub> | S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)- propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysin                              |
| Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> | N- Palmitoyl-S-[2,3- bis( palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]- cysteinyl-[S]- seryl-[S]- lysyl-[S]- lysyl-[S]- lysyl-[S]-lysin |
| PBMC                              | <i>peripheral blood monocyte</i>   |
| PBS                               | <i>phosphat buffered saline</i>  |
| PCR                               | Polymerase Ketten Reaktion   |
| PE                                | Phycoerythrin  |
| PFU                               | <i>Plaque-forming units</i>  |
| PI3K                              | <i>phosphatidylinsoitol 3-kinase</i>   |
| PRR                               | <i>pattern recognition receptor</i>  |
| RAGE                              | <i>receptor for advanced glycation end-products</i>  |
| RelA                              | <i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A</i>  |
| RNA                               | Ribonukleinsäure   |

|         |   |
|---------|---|
| RNase   | Ribonuklease  |
| RP105   | <i>Radioprotective 105</i>  |
| RSV     | Respiratory-Syncytial-Virus   |
| RT      | Raumtemperatur (21°C-25°C)  |
| s       | lösliches, <i>soluble</i>   |
| SAP     | Shrimp Alkaline Phosphatase   |
| SCID    | <i>severe combined immunodeficiency disorder</i>                        |
| SD      | Standardabweichung  |
| sec     | Sekunde(n)  |
| SIGIRR  | <i>single immunoglobulin IL-1R-related molecule</i>                     |
| SIRS    | <i>systemic inflammatory response syndrome</i>                          |
| SOCS1   | <i>suppressor of cytokine signalling 1</i>                              |
| SS      | Seitenstreulicht, <i>sideward scatter</i>                               |
| ss      | Einzelstrang-, <i>single-strand</i>                                     |
| T2/1-Fc | lösliches Maus-TLR2/TLR1-hlgG-Fc  |
| T2/6-Fc | lösliches Maus-TLR2/TLR6-hlgG-Fc  |
| TAB     | <i>TAK1 binding proteins</i>  |
| TAK1    | <i>transforming growth factor-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i> |
| TIR     | Toll/IL-1R-Domäne   |
| TIRAP   | <i>TIR domain-containing adaptor protein</i>                            |
| TLR     | <i>Toll-like</i> Rezeptor   |
| TNF     | Tumornekrosefaktor  |
| TRAF    | <i>TNFR-associated factor</i>   |
| TRAILR  | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>                   |
| TRAM    | <i>TRIF related adaptor molecule</i>                                    |
| TRIF    | <i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-<math>\beta</math></i>    |
| TRIS    | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| VSV     | Vesicular-Stomatitis-Virus  |
| WT      | Wildtyp   |
| X/Yz%   | Stoff Y ist in Stoff X zu z Prozent (V/V) oder (m/V) enthalten          |
| X-R     | Xrezeptor   |

## 9 Literaturverzeichnis

1. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*; 284:1313-1318 (1999)
2. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*; 449:819-826 (2007)
3. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*; 4:469-478 (2004)
4. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*; 20:197-216 (2002)
5. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*; 91:295-298 (1997)
6. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 54 Pt 1:1-13 (1989)
7. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*; 12:991-1045 (1994)
8. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*; 81:1-5 (2007)
9. Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe*; 3:352-363 (2008)
10. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*; 314:994-997 (2006)
11. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*; 448:501-505 (2007)
12. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*; 440:237-241 (2006)
13. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*; 453:1122-1126 (2008)
14. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*; 452:103-107 (2008)
15. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*; 197:1119-1124 (2003)
16. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*; 197:1107-1117 (2003)

17. Anderson KV, Nusslein-Volhard C. Information for the dorsal--ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*; 311:223-227 (1984)
18. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*; 86:973-983 (1996)
19. Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature*; 426:33-38 (2003)
20. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*; 388:394-397 (1997)
21. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*; 282:2085-2088 (1998)
22. Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol*; 67:508-514 (2000)
23. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, Kuroki Y. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*; 8:124 (2007)
24. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*; 17:1-14 (2005)
25. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*; 124:783-801 (2006)
26. Schumann RR, Leong SR, Flagg GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*; 249:1429-1431 (1990)
27. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol*; 297:353-363 (2007)
28. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*; 249:1431-1433 (1990)
29. Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol*; 141:547-552 (1988)
30. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med*; 189:1777-1782 (1999)
31. Ohto U, Fukase K, Miyake K, Satow Y. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVa. *Science*; 316:1632-1634 (2007)
32. Viriyakosol S, Kirkland T, Soldau K, Tobias P. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J Endotoxin Res*; 6:489-491 (2000)
33. Visintin A, Latz E, Monks BG, Espevik T, Golenbock DT. Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem*; 278:48313-48320 (2003)
34. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*; 3:667-672 (2002)

35. Fujimoto T, Yamazaki S, Eto-Kimura A, Takeshige K, Muta T. The amino-terminal region of toll-like receptor 4 is essential for binding to MD-2 and receptor translocation to the cell surface. *J Biol Chem*; 279:47431-47437 (2004)
36. Mullen GE, Kennedy MN, Visintin A, Mazzoni A, Leifer CA, Davies DR, Segal DM. The role of disulfide bonds in the assembly and function of MD-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100:3919-3924 (2003)
37. Kim HM, Park BS, Kim JI, Kim SE, Lee J, Oh SC, Enkhbayar P, Matsushima N, Lee H, Yoo OJ, Lee JO. Crystal structure of the TLR4-MD-2 complex with bound endotoxin antagonist Eritoran. *Cell*; 130:906-917 (2007)
38. Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Huber M, Kalis C, Keck S, Galanos C, Freudenberg M, Beutler B. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat Immunol*; 6:565-570 (2005)
39. Zahringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C. T. *Immunobiology*; 213:205-224 (2008)
40. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*; 274:17406-17409 (1999)
41. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*; 11:443-451 (1999)
42. Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C, Boneca IG. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep*; 5:1000-1006 (2004)
43. Hashimoto M, Tawaratsumida K, Kariya H, Kiyohara A, Suda Y, Kriksa F, Kirika T, Gotz F. Not lipoteichoic acid but lipoproteins appear to be the dominant immunobiologically active compounds in *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*; 177:3162-3169 (2006)
44. Tapping RI, Tobias PS. Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. *J Endotoxin Res*; 9:264-268 (2003)
45. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96:14459-14463 (1999)
46. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*; 401:811-815 (1999)
47. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*; 13:933-940 (2001)
48. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*; 169:10-14 (2002)
49. Triantafilou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, Triantafilou K. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem*; 281:31002-31011 (2006)
50. Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*; 130:1071-1082 (2007)

51. Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmuller KH, Jung G, Brock R, Akira S, Ulmer AJ. *J Biol Chem*; 281:9049-9057 (2006)
52. Sellati TJ, Bouis DA, Kitchens RL, Darveau RP, Pugin J, Ulevitch RJ, Gangloff SC, Goyert SM, Norgard MV, Radolf JD. Treponema pallidum and Borrelia burgdorferi lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytic cells via a CD14-dependent pathway distinct from that used by lipopolysaccharide. *J Immunol*; 160:5455-5464 (1998)
53. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringer U, Beutler B. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*; 433:523-527 (2005)
54. Viriyakosol S, Fierer J, Brown GD, Kirkland TN. Innate immunity to the pathogenic fungus Coccidioides posadasii is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun*; 73:1553-1560 (2005)
55. Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR, Li X. Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem*; 278:16713-16719 (2003)
56. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*; 413:78-83 (2001)
57. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*; 2:835-841 (2001)
58. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*; 4:499-511 (2004)
59. Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene*; 26:3214-3226 (2007)
60. Chen F, Bhatia D, Chang Q, Castranova V. Finding NEMO by K63-linked polyubiquitin chain. *Cell Death Differ*; 13:1835-1838 (2006)
61. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*; 16:225-260 (1998)
62. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*; 6:644-658 (2006)
63. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*; 13:460-469 (2007)
64. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*; 11:115-122 (1999)
65. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*; 167:5887-5894 (2001)
66. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*; 169:6668-6672 (2002)
67. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol*; 4:161-167 (2003)



68. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*; 4:1144-1150 (2003)
69. Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem*; 278:49751-49762 (2003)
70. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, Akira S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*; 171:4304-4310 (2003)
71. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol*; 5:503-507 (2004)
72. Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF-(kappa)B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem*; 280:36560-36566 (2005)
73. Hacker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, Raz E, Wagner H, Hacker G, Mann M, Karin M. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*; 439:204-207 (2006)
74. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*; 9:361-368 (2008)
75. Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, Liew FY. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol*; 5:373-379 (2004)
76. Qin J, Qian Y, Yao J, Grace C, Li X. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J Biol Chem*; 280:25233-25241 (2005)
77. Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, Kuang AA, Ho M, Morici LA, Lenz LL, Cado D, Riley LW, Winoto A. TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity*; 21:877-889 (2004)
78. Hardy MP, O'Neill LA. The murine IRAK2 gene encodes four alternatively spliced isoforms, two of which are inhibitory. *J Biol Chem*; 279:27699-27708 (2004)
79. Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med*; 197:263-268 (2003)
80. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*; 110:191-202 (2002)
81. Kinjyo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, Mori H, Aki D, Ohishi M, Yoshida H, Kubo M, Yoshimura A. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity*; 17:583-591 (2002)
82. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kimura A, Abe T, Seki E, Sato S, Takeuchi O, Takeda K, Akira S, Yamanishi K, Kawase I, Nakanishi K, Kishimoto T. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity*; 17:677-687 (2002)
83. Chuang TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol*; 5:495-502 (2004)



84. Fukao T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Matsuda S, Asano T, Kadowaki T, Takeuchi T, Koyasu S. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat Immunol*; 3:875-881 (2002)
85. Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol*; 6:777-784 (2005)
86. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, Hurley P, Chien M, Chai S, Hitotsumatsu O, McNally E, Pickart C, Ma A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol*; 5:1052-1060 (2004)
87. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*; 5:800-808 (2004)
88. Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, Eckmann L, Karin M. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science*; 307:734-738 (2005)
89. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*; 5:446-458 (2005)
90. Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, Finberg RW, Tarakhovskiy A, Vogel SN, Belkaid Y, Kurt-Jones EA, Karp CL. Inhibition of TLR-4/MD-2 signaling by RP105/MD-1. *J Endotoxin Res*; 11:363-368 (2005)
91. BRAUDE AI, JONES JL, DOUGLAS H. The behavior of Escherichia coli endotoxin (somatic antigen) during infectious arthritis. *J Immunol*; 90:297-311 (1963)
92. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*; 101:1644-1655 (1992)
93. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*; 420:885-891 (2002)
94. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury*; 36:691-709 (2005)
95. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*; 29:1303-1310 (2001)
96. Zipris D, Lien E, Xie JX, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA. TLR activation synergizes with Kilham rat virus infection to induce diabetes in BBDR rats. *J Immunol*; 174:131-142 (2005)
97. Leon CG, Tory R, Jia J, Sivak O, Wasan KM. Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharm Res*; 25:1751-1761 (2008)
98. Calandra T, Glauser MP, Schellekens J, Verhoef J. Treatment of gram-negative septic shock with human IgG antibody to Escherichia coli J5: a prospective, double-blind, randomized trial. *J Infect Dis*; 158:312-319 (1988)
99. Greenman RL, Schein RM, Martin MA, Wenzel RP, MacIntyre NR, Emmanuel G, Chmel H, Kohler RB, McCarthy M, Plouffe J, . A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. The XOMA Sepsis Study Group. *JAMA*; 266:1097-1102 (1991)
100. Zimmermann M, Busch K, Kuhn S, Zeppezauer M. Endotoxin adsorbent based on immobilized human serum albumin. *Clin Chem Lab Med*; 37:373-379 (1999)

101. Reinhart K, Gluck T, Ligtenberg J, Tschaikowsky K, Bruining A, Bakker J, Opal S, Moldawer LL, Axtelle T, Turner T, Souza S, Pribble J. CD14 receptor occupancy in severe sepsis: results of a phase I clinical trial with a recombinant chimeric CD14 monoclonal antibody (IC14). *Crit Care Med*; 32:1100-1108 (2004)
102. Wurfel MM, Hailman E, Wright SD. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J Exp Med*; 181:1743-1754 (1995)
103. Kitchens RL, Thompson PA, Viriyakosol S, O'Keefe GE, Munford RS. Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest*; 108:485-493 (2001)
104. Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90:12040-12044 (1993)
105. Winchell WW, Hardy J, Levine DM, Parker TS, Gordon BR, Saal SD. Effect of administration of a phospholipid emulsion on the initial response of horses administered endotoxin. *Am J Vet Res*; 63:1370-1378 (2002)
106. Nahra R, Dellinger RP. Targeting the lipopolysaccharides: still a matter of debate? *Curr Opin Anaesthesiol*; 21:98-104 (2008)
107. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem*; 76:141-165 (2007)
108. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*; 111:927-930 (2002)
109. Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*; 76:514-519 (2004)
110. Symons JA, Duff GW. A soluble form of the interleukin-1 receptor produced by a human B cell line. *FEBS Lett*; 272:133-136 (1990)
111. Novick D, Engelmann H, Wallach D, Rubinstein M. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J Exp Med*; 170:1409-1414 (1989)
112. Engelmann H, Novick D, Wallach D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem*; 265:1531-1536 (1990)
113. Raines MA, Liu L, Quan SG, Joe V, DiPersio JF, Golde DW. Identification and molecular cloning of a soluble human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 88:8203-8207 (1991)
114. Fischer DG, Tal N, Novick D, Barak S, Rubinstein M. An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferon. *Science*; 262:250-253 (1993)
115. Heaney ML, Golde DW. Soluble receptors in human disease. *J Leukoc Biol*; 64:135-146 (1998)
116. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*; 58:573-581 (1989)
117. Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikacharoen T, Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol*; 165:6682-6686 (2000)
118. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, Griffin GE, Ferrara P, Schiffrin EJ, Morgan BP, Labeta MO. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2

- capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol*; 171:6680-6689 (2003)
119. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem*; 275:2251-2254 (2000)
120. Brandl K. Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung der Toll-like Rezeptoren in der Sepsis. (2005).
121. Kennedy MN, Mullen GE, Leifer CA, Lee C, Mazzoni A, Dileepan KN, Segal DM. A complex of soluble MD-2 and lipopolysaccharide serves as an activating ligand for Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*; 279:34698-34704 (2004)
122. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 51 Pt 1:263-273 (1986)
123. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*; 36:59-74 (1977)
124. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 76:4350-4354 (1979)
125. Lehr RV, Elefante LC, Kikly KK, O'Brien SP, Kirkpatrick RB. A modified metal-ion affinity chromatography procedure for the purification of histidine-tagged recombinant proteins expressed in *Drosophila* S2 cells. *Protein Expr Purif*; 19:362-368 (2000)
126. Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH, Jr. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem*; 180:195-204 (1989)
127. Tomiya N, Narang S, Lee YC, Betenbaugh MJ. Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycoconj J*; 21:343-360 (2004)
128. Wang J, Kobayashi M, Han M, Choi S, Takano M, Hashino S, Tanaka J, Kondoh T, Kawamura K, Hosokawa M. MyD88 is involved in the signalling pathway for Taxol-induced apoptosis and TNF-alpha expression in human myelomonocytic cells. *Br J Haematol*; 118:638-645 (2002)
129. Zimmer SM, Liu J, Clayton JL, Stephens DS, Snyder JP. Paclitaxel Binding to Human and Murine MD-2. *J Biol Chem*; 283:27916-27926 (2008)
130. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*; 1:398-401 (2000)
131. Georgel P, Jiang Z, Kunz S, Janssen E, Mols J, Hoebe K, Bahram S, Oldstone MB, Beutler B. Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Virology*; 362:304-313 (2007)
132. Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R, Ross SR. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99:2281-2286 (2002)
133. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*; 285:248-251 (1999)

134. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*; 5:331-342 (2005)
135. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ, Yang H. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*; 26:174-179 (2006)
136. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*; 290:C917-C924 (2006)
137. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*; 112:1796-1808 (2003)
138. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*; 112:1821-1830 (2003)
139. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*; 116:3015-3025 (2006)
140. Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, Kopp A, Schoelmerich J, Falk W. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*; (2008)
141. Grey HM, Kunkel HG. H CHAIN SUBGROUPS OF MYELOMA PROTEINS AND NORMAL 7S GAMMA-GLOBULIN. *J Exp Med*; 120:253-266 (1964)
142. Burton DR, Gregory L, Jefferis R. Aspects of the molecular structure of IgG subclasses. *Monogr Allergy*; 19:7-35 (1986)
143. Spiegelberg HL. Biological role of different antibody classes. *Int Arch Allergy Appl Immunol*; 90 Suppl 1:22-27 (1989)
144. Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annu Rev Biochem*; 46:723-763 (1977)
145. Davis W, Harrison PT, Hutchinson MJ, Allen JM. Two distinct regions of FC gamma RI initiate separate signalling pathways involved in endocytosis and phagocytosis. *EMBO J*; 14:432-441 (1995)
146. Karimi K, Gemmill TR, Lennartz MR. Protein kinase C and a calcium-independent phospholipase are required for IgG-mediated phagocytosis by Mono-Mac-6 cells. *J Leukoc Biol*; 65:854-862 (1999)
147. Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*; 41:456-461 (1988)
148. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*; 12:322-326 (1991)
149. Cooper NR. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol*; 37:151-216 (1985)
150. Kawasaki K, Nogawa H, Nishijima M. Identification of mouse MD-2 residues important for forming the cell surface TLR4-MD-2 complex recognized by anti-TLR4-MD-2 antibodies, and for conferring LPS and taxol responsiveness on mouse TLR4 by alanine-scanning mutagenesis. *J Immunol*; 170:413-420 (2003)

151. Nishitani C, Mitsuzawa H, Hyakushima N, Sano H, Matsushima N, Kuroki Y. The Toll-like receptor 4 region Glu24-Pro34 is critical for interaction with MD-2. *Biochem Biophys Res Commun*; 328:586-590 (2005)
152. Schnabl B, Brandl K, Fink M, Gross P, Taura K, Gabele E, Hellerbrand C, Falk W. A TLR4/MD2 fusion protein inhibits LPS-induced pro-inflammatory signaling in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 375:210-214 (2008)
153. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med*; 321:280-287 (1989)
154. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*; 162:3749-3752 (1999)
155. Munford RS. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. *Annu Rev Pathol*; 1:467-496 (2006)
156. O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, Formal SB. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J Immunol*; 124:20-24 (1980)
157. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet*; 365:63-78 (2005)
158. Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J, Marsters SA, Gregory T, Mitsuya H, Byrn RA, Lucas C, Wurm FM, Groopman JE, . Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature*; 337:525-531 (1989)
159. da Silva CJ, Ulevitch RJ. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem*; 277:1845-1854 (2002)
160. Brandl K, Gluck T, Hartmann P, Salzberger B, Falk W. A designed TLR4/MD-2 complex to capture LPS. *J Endotoxin Res*; 11:197-206 (2005)
161. Hyakushima N, Mitsuzawa H, Nishitani C, Sano H, Kuronuma K, Konishi M, Himi T, Miyake K, Kuroki Y. Interaction of soluble form of recombinant extracellular TLR4 domain with MD-2 enables lipopolysaccharide binding and attenuates TLR4-mediated signaling. *J Immunol*; 173:6949-6954 (2004)
162. Bausinger H, Lipsker D, Ziylan U, Manie S, Briand JP, Cazenave JP, Muller S, Haeuw JF, Ravanat C, de la SH, Hanau D. Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur J Immunol*; 32:3708-3713 (2002)
163. Ding AH, Porteu F, Sanchez E, Nathan CF. Shared actions of endotoxin and taxol on TNF receptors and TNF release. *Science*; 248:370-372 (1990)
164. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med*; 192:565-570 (2000)
165. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andre F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*; 13:1050-1059 (2007)
166. Kim JK. Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metab*; 4:417-419 (2006)



167. Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, Sizemore N, Hwang DH. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*; 278:37041-37051 (2003)
168. Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*; 276:16683-16689 (2001)
169. Schneewind O, Fowler A, Faull KF. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science*; 268:103-106 (1995)
170. Moks T, Abrahmsen L, Nilsson B, Hellman U, Sjoquist J, Uhlen M. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur J Biochem*; 156:637-643 (1986)
171. Tissieres P, Dunn-Siegrist I, Schappi M, Elson G, Comte R, Nobre V, Pugin J. Soluble MD-2 is an acute-phase protein and an opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood*; 111:2122-2131 (2008)
172. Jain V, Halle A, Halmen KA, Lien E, Charrel-Dennis M, Ram S, Golenbock DT, Visintin A. Phagocytosis and intracellular killing of MD-2 opsonized gram-negative bacteria depend on TLR4 signaling. *Blood*; 111:4637-4645 (2008)
173. Lugtenberg B, Van Alphen L. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*; 737:51-115 (1983)
174. Harrison PT, Davis W, Norman JC, Hockaday AR, Allen JM. Binding of monomeric immunoglobulin G triggers Fc gamma RI-mediated endocytosis. *J Biol Chem*; 269:24396-24402 (1994)
175. Jann K, Jann B. Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can J Microbiol*; 38:705-710 (1992)
176. Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, Kikuchi T, Takamura N, Nagai Y, Kusumoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Adachi Y, Kosugi A, Miyake K. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med*; 198:1035-1042 (2003)
177. Saitoh S, Akashi S, Yamada T, Tanimura N, Kobayashi M, Konno K, Matsumoto F, Fukase K, Kusumoto S, Nagai Y, Kusumoto Y, Kosugi A, Miyake K. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int Immunol*; 16:961-969 (2004)
178. Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*; 11:725-732 (2001)
179. Peters M, Blinn G, Solem F, Fischer M, Meyer zum Buschenfelde KH, Rose-John S. In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J Immunol*; 161:3575-3581 (1998)
180. Novick D, Rubinstein M. The tale of soluble receptors and binding proteins: from bench to bedside. *Cytokine Growth Factor Rev*; 18:525-533 (2007)
181. Tatsis N, Fitzgerald JC, Reyes-Sandoval A, Harris-McCoy KC, Hensley SE, Zhou D, Lin SW, Bian A, Xiang ZQ, Iparraguirre A, Lopez-Camacho C, Wherry EJ, Ertl HC. Adenoviral vectors persist in vivo and maintain activated CD8+ T cells: implications for their use as vaccines. *Blood*; 110:1916-1923 (2007)
182. Mitsuzawa H, Nishitani C, Hyakushima N, Shimizu T, Sano H, Matsushima N, Fukase K, Kuroki Y. Recombinant soluble forms of extracellular TLR4 domain and MD-2 inhibit

- lipopolysaccharide binding on cell surface and dampen lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in mice. *J Immunol*; 177:8133-8139 (2006)
183. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med*; 175:323-329 (1992)
184. Sato TA, Widmer MB, Finkelman FD, Madani H, Jacobs CA, Grabstein KH, Maliszewski CR. Recombinant soluble murine IL-4 receptor can inhibit or enhance IgE responses in vivo. *J Immunol*; 150:2717-2723 (1993)
185. Weber AN, Morse MA, Gay NJ. Four N-linked glycosylation sites in human toll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion. *J Biol Chem*; 279:34589-34594 (2004)
186. Kuroishi T, Tanaka Y, Sakai A, Sugawara Y, Komine K, Sugawara S. Human parotid saliva contains soluble toll-like receptor (TLR) 2 and modulates TLR2-mediated interleukin-8 production by monocytic cells. *Mol Immunol*; 44:1969-1976 (2007)
187. Rehli M. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol*; 23:375-378 (2002)
188. Farhat K, Riekenberg S, Heine H, Debarry J, Lang R, Mages J, Buwitt-Beckmann U, Roschmann K, Jung G, Wiesmuller KH, Ulmer AJ. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol*; 83:692-701 (2008)
189. Spiller S, Elson G, Ferstl R, Dreher S, Mueller T, Freudenberg M, Daubeuf B, Wagner H, Kirschning CJ. TLR4-induced IFN-gamma production increases TLR2 sensitivity and drives Gram-negative sepsis in mice. *J Exp Med*; 205:1747-1754 (2008)



## 10 Anhang

### 10.1 Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Posterbeiträge auf Kongressen oder in wissenschaftlichen Zeitschriften vorgestellt. Die Titel der Publikationen sind im Folgenden aufgelistet.

#### Originalarbeiten

Schäffler A., **Groß P.**, Büttner R., Bollheimer C., Büchler C., Neumeier M., Kopp A., Schölmerich J., Falk W.: Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. Immunology; (2008)

Schnabl B., Brandl K., Fink M., **Groß P.**, Taura K., Gäbele E., Hellerbrand C., Falk W.: A TLR4/MD2 fusion protein inhibits LPS-induced pro-inflammatory signaling in hepatic stellate cells. Biochemical and Biophysical Research Communications; (2008)

Kopp A., **Groß P.**, Falk W., Bala M., Weigert J., Büchler C., Neumeier M., Schölmerich J., Schäffler A.: Functional screening of dietary fatty acids revealed eicosapentaenoic acid as a specific LPS-antagonist conferring potent anti-inflammatory effects on monocytic THP-1 cells and human primary monocytes  
Manuskript eingereicht

**Groß P.**, Brandl K., Dierkes C., Schölmerich J., Salzberger B., Glück T., Falk W.: The LPS-Trap-Fc: A multifunctional agent to battle Gram-negative bacteria  
Manuskript eingereicht

## Posterbeiträge

**Groß P.**, Schnabl B., Falk W.: Die LPS-Trap, eine Januswaffe gegen die bakterielle Sepsis?

9. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin (KIT 2008), Innsbruck (02/2008)

**Groß P.**, Dierkes C., Salzberger B., Falk W.: TLR4/MD-2 fusion proteins as opsonins for Gram negative bacteria

Joint Annual Meeting of Immunology of Austrian and German Societies, Wien (09/2008)

## 10.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden oder auf andere Weise erleichtert haben, bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit und die großzügige Unterstützung der Forschung an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I.

Zu großem Dank bin ich meinem Betreuer Prof. Dr. Werner Falk verpflichtet. Durch ihn wurde es mir ermöglicht, ein spannendes Thema in einem hochinteressanten Forschungsfeld in einer wünschenswerten Art und Weise zu bearbeiten. Er gewährte mir größtmögliche Freiheiten in meiner Forschungsarbeit, während gleichzeitig seine Tür für auch noch so triviale Fragen immer offenstand. Seine Ansichten halfen mir im undurchsichtigen Feld der Wissenschaft und Forschung einigermaßen klaren Blick zu behalten.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann für die unkomplizierte fakultätsinterne Betreuung dieser Dissertation und dem Interesse am Fortschritt meiner Arbeit.

Bei Dr. Bernd Echtenacher möchte ich mich für die große Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente bedanken. Herrn Dr. Bernd Schnabl danke ich für die Überlassung der LPS-Trap-Fc-Adenoviren.

Bei allen Arbeitskolleg(inn)en aus dem Forschungsbau H1 möchte ich mich für die nette Zusammenarbeit bedanken. Ein außerordentlicher Dank geht an meine Laborkolleginnen Lisa Aschenbrenner, Kirstin Pollinger und Daniela Vogl, die mich 3 Jahre ertragen mussten. Ohne das guldige Anlernen, die technische Unterstützung und die nützlichen Tipps wäre vieles schwieriger bzw. unmöglich gewesen. Trotz der eindeutigen weiblichen Übermacht musste ich nur selten um meine physische und psychische Gesundheit fürchten. Bei meinen Mitforschern aus Gastroenterologie Frau Dr. Claudia Hofmann und Dr. Katrin Kosovac möchte ich mich für die konstruktiven Gespräche und der Hilfe v.a. bei der Niederschrift dieser Arbeit

danken. Christoph Dorn, Alexander Faßold, Stefanie Haas, Christine Wolff und Matt Groening danke ich für die vergangenen After-Work-Diskussionsrunden in aufgelockerter Atmosphäre. Nicht vergessen möchte ich Frau Doris Müller, die als gute Fee im Hintergrund immer für optimale Arbeitsbedingungen sorgte.

Ganz besonders möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung mein Studium und damit auch diese Arbeit möglich gewesen wären.

Zu guter Letzt möchte ich noch Christine, Elke, Karin, Kathrin, Stephan, Sven und meiner Hornhautverkrümmung danken, ohne die ich mein Studium mit bedeutend weniger Freude (oder gar nicht) durchgezogen hätte.

Vielen Dank !

### 10.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitates gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 23.12.2008

---

(Philipp Groß)